

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 9 月 1 日 (01.09.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/080570 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/12, C12Q 1/68, C12M 1/00, 1/34, G01N 33/53, 33/574, 37/00

(74) 代理人: 小林 浩, 外(KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目 8 番 7 号 福岡ビル 9 階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/012455

(22) 国際出願日: 2004 年 8 月 24 日 (24.08.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2004-048593 2004 年 2 月 24 日 (24.02.2004) JP

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三菱レイヨン株式会社 (MITSUBISHI RAYON CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1088506 東京都港区港南一丁目 6 番 4 1 号 Tokyo (JP). 学校法人日本医科大学 (NIPPON MEDICAL SCHOOL) [JP/JP]; 〒1130022 東京都文京区千駄木一丁目 1 - 5 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 江見 充 (EMI, Mitsuru) [JP/JP]; 〒1130022 東京都文京区千駄木一丁目 1 - 5 日本医科大学内 Tokyo (JP). 音田 正光 (ONDA, Masamitsu) [JP/JP]; 〒1130022 東京都文京区千駄木一丁目 1 - 5 日本医科大学内 Tokyo (JP). 永井 尚生 (NAGAI, Naoki) [JP/JP]; 〒1130022 東京都文京区千駄木一丁目 1 - 5 日本医科大学内 Tokyo (JP).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: GENE RELATING TO ESTIMATION OF POSTOPERATIVE PROGNOSIS FOR BREAST CANCER

(54) 発明の名称: 乳癌の術後予後予測に関与する遺伝子

(57) Abstract: It is intended to provide a system of estimating the postoperative prognosis in a patient with breast cancer from the viewpoint of gene expression based on the data obtained by genome-wide and comprehensive analysis on gene expression in breast cancer. Expression of human genes is comprehensively analyzed by using a DNA microarray and gene expression functions in various breast cancer conditions are compared, thereby establishing a system of estimating the postoperative prognosis for breast cancer.

(57) 要約: 乳癌における遺伝子発現をゲノムワイドにかつ網羅的に解析した結果に基づき、乳癌患者の術後予後を遺伝子発現の観点から予測するシステムを提供することを課題とする。ヒト遺伝子の遺伝子発現を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析し、様々な状態にある乳癌の遺伝子発現機能を比較することにより、乳癌術後予後予測システムを確立した。



WO 2005/080570 A1

明 細 書

乳癌の術後予後予測に関与する遺伝子

5 技術分野

本発明は、乳癌の術後予後予測に関与する遺伝子に関する。さらに、この遺伝子を使った乳癌の術後予後の検査方法、乳癌の術後予後を制御する癌治療薬のスクリーニング方法、及び乳癌の術後予後の診断キットに関する。

10 背景技術

乳癌は女性の癌死亡率の上位原因に位置する疾患であるが、いまだに生物学的見地からの悪性度、生存予後を規定する有力な因子は見出されていない。

エストロゲンレセプター（ER）の状態はヒト乳癌についての、臨床及び生物学的な症状の1つの決定要素である。アジュバントホルモン治療は、年齢、閉経期の状態、腋窩リンパ節（axillary node）の関与、あるいは腫瘍径にかかわらずER陽性の乳癌患者において通常有効である；しかしながら、ER陰性乳癌は、この治療方法に対して抵抗性がある（J Clin Oncology (2001) 19, 3817-1827.、Breast Cancer (2001) 8,298-304.）。ER陰性腫瘍を持っている患者が、化学療法に対して同じ応答をいつも示すものではない。そして、現存する指標では、臨床の症状によりこのタイプの乳癌を分別することができないことから、手術後の予後は、多様であると言える（J Natl Cancer Inst (1991) 83, 154-155.、J Natl Cancer Inst (2000) 93, 979-989.）。

また、リンパ節転移の無い乳癌患者（node陰性乳癌；n0）の予後は、転移乳癌患者におけるよりは良い。しかし、日本において、本発明者らは、node陰性乳癌患者の16%が最初の手術後5年以内に再発することを見出している（Clin Cancer Res (2000) 6,3193-3198.）。

乳癌患者の術後予後予測は、現在利用できるアジュバント（adjuvant）治療の観点から重要性が増している。術後に再発しそうな患者を同定することに役立つ

遺伝子マーカーは、ハイリスクな患者に適当な術前アジュバント療法を行い得る利益をもたらす、不要かつ煩雑で不快な副作用をもたらすことが阻止可能となる。

従来、個々の患者のための術後の処置決定は腫瘍径及びステージ、リンパ節への転移、臨床病理学的因子による診断、及びホルモンレセプターの検索などにより行われてきたが、決定的な方法ではなかった (Cancer (1982) 50, 2131-2138., Histopathology (1991) 19, 403-410., Int J Cancer (1996) 69, 135-141., Am J Clin Oncol (1997) 20, 546-551., Eur J Cancer (2002) 38, 1329-1334., Jpn J Cancer Res (2000) 91, 293-300.)。

近年、術後の乳癌患者の予後マーカーとして遺伝子の変異の重要性を決定しようとしたものがある。これらの遺伝子の変異にはp53の変異 (Breast Cancer Res Treat (2001) 69, 65-68.)、いくつかの対立遺伝子でのヘテロ接合性の欠失 (Int J Clin Oncol (2001) 6, 6-12.)、BRCA2遺伝子 (Int J Cancer (2002) 98, 879-882.)、WT1遺伝子 (Clin Cancer Res (2002) 8, 1167-1171)、HER2/neu遺伝子 (Arch Surg (2000) 135, 1469-1474.)、及びKi-67遺伝子 (J Pathol (1999) 187, 207-216.)の異常な発現を含む。しかしながら、癌が多遺伝子の異常の集積による疾患であることを考えると、有効な予後予測手段とは言いがたい。

さらに、近年各種生物におけるゲノムプロジェクトが進められており、ヒト遺伝子をはじめとして、多数の遺伝子とその塩基配列が急速に明らかにされつつある。配列の明らかにされた遺伝子の機能については、各種の方法で調べることができる。その有力な方法の一つとして、明らかにされた塩基配列情報を利用した遺伝子発現解析が知られている。例えば、ノーザンハイブリダイゼーションに代表されるような、各種の核酸-核酸間ハイブリダイゼーション反応や各種のPCR反応を利用した方法が開発され、当該方法により各種遺伝子とその生体機能発現との関係を調べることができる。これらの方法では適用し得る遺伝子の数に制限があるが、今日のゲノムプロジェクトを通して明らかにされつつあるような、一個体レベルという極めて多数の遺伝子の総合的・系統的解析を行うために、多数遺伝子の一括発現解析を可能とするDNAマイクロアレイ法 (DNAチップ法) と呼ばれる新しい分析法、及び方法論が開発されてきた。

DNAマイクロアレイとしては、リソグラフィー技術を応用して区画化された多数のセル上にDNA合成を行ったもの（USP 5445934）、基盤上に溝又は穴で区画を形成し、該区画の内壁にプローブを固定化したもの（特開平11-108928号、特開2000-78998号）、チップ上に固定するプローブ量を多くするために、アクリルアミド等のゲルにプローブを固定したマイクロアレイ（USP5770721、特開2000-60554号）等、多数の形状物が知られている。

また、核酸固定化ゲルを保持する核酸固定化ゲル保持繊維配列体を作製し、この配列体を配列体の繊維軸と交差する方向に切断することにより得られるマイクロアレイも知られている（特開2000-270878号、特開2000-270879号）。

最近の研究により、癌診断のための新規な遺伝子マーカーの同定にcDNAマイクロアレイ技術が有効であることがわかった。現在までに、数人の研究者が乳癌のマイクロアレイ分析を行っているが、乳癌の術後予後予測の可能な乳癌遺伝子発現特性のデータを記述したものはない（Proc Natl Acad Sci U S A (1999) 96, 9212-9217.、Nature (2000) 406, 747-752.、Proc Natl Acad Sci U S A (2001) 98,11462-11467.、Cancer Res (2001) 61, 5979-5984.、Cancer Res (2000) 60, 2232-2238.、Cancer Res (2001) 61, 5168-5178.、Proc Natl Acad Sci U S A (2001) 98, 10869-10874.）。一つの例外として、リンパ節の転移陰性腫瘍の特定のプロファイルが、遠隔転移への進行前の短い間隔を予測することを示す。（N Engl J Med (2002) 347, 1999-2009.）。

発明の開示

本発明の目的は、乳癌における遺伝子発現をゲノムワイドにかつ網羅的に解析した結果に基づき、乳癌患者の術後予後を遺伝子発現の観点から予測する画期的な手段を提供することを課題とする。

本発明は、ヒト遺伝子の遺伝子発現をDNAマイクロアレイにより網羅的に解析し、様々な状態にある乳癌の遺伝子発現機能を比較することにより、乳癌術後予後予測システムを確立した。

すなわち、本発明は、以下の（１）～（８）の遺伝子（群）である。

(1) 乳癌の術後予後予測に関与する以下の定義の少なくとも1よりなる遺伝子；

1) エストロゲンレセプター陰性の乳癌において、外科手術後5年以内に死亡した乳癌患者からの遺伝子 (5y-Dグループ) と数年以上無病 (disease-free) 生存した患者からの遺伝子 (5y-Sグループ) とが、その発現機能によって区別することができたマーカー遺伝子群。

2) 手術時にリンパ節への転移がなかった (node陰性) (n0) 乳癌において、手術後5年以内に再発したn0乳癌患者からの遺伝子 (5Y-Rグループ) と5年以上の間無病生存した患者からの遺伝子 (5Y-Fグループ) とが、その発現機能によって区別することができたマーカー遺伝子群。

3) 原発性乳癌において、外科手術後5年以内に死亡した乳癌患者からの遺伝子 (5Dグループ) と数年以上無病生存した患者からの遺伝子 (5Sグループ) とが、その発現機能によって区別することができたマーカー遺伝子群。

(2) 原発性乳癌の術後予後予測に関与する以下の配列より選ばれる遺伝子；

pro-alpha-1 type 3 collagen (PIIIP)、
complement component C1r、
dihydropyrimidinase-like 3 (DPYSL3)、
protein tyrosine kinase 9-like (PTK9L)、
carboxypeptidase E (CPE)、
alpha-tubulin、
beta-tubulin、
heat shock protein HSP 90-alpha gene、
malate dehydrogenase、
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 3 (NDUFB3)。

(3) 原発性乳癌の術後予後予測に関与する予後の良い群で高発現する以下から選ばれる遺伝子；

pro-alpha-1 type 3 collagen (PIIIP)、
complement component C1r、

dihydropyrimidinase-like 3 (DPYSL3)、
 protein tyrosine kinase 9-like (PTK9L)、
 carboxypeptidase E (CPE)、
 alpha-tubulin、
 5 beta-tubulin。

(4) 原発性乳癌の術後予後予測に関与する予後の悪い群で高発現する以下から選ばれる遺伝子；

heat shock protein HSP 90-alpha gene、
 malate dehydrogenase、

10 NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 3 (NDUFB3)。

(5) 手術時にリンパ節への転移がなかった (node陰性) (n0) 乳癌において、術後予後予測に関与する以下の配列より選ばれる遺伝子；

AF058701/ DNA polymerase zeta catalytic subunit (REV3) 、

AI066764/ lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1)、

15 x15940/ ribosomal protein L31.、

Hs.94653/ neurochondrin(KIAA0607)、

M13436/ ovarian beta-A-inhibin、

Hs.5002/ copper chaperone for superoxide dismutase; CCS、

D67025/ proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 3、

20 M80469/ MHC class I HLA-J gene、

Hs.4864/ ESTs、

Hs.106326/ ESTs。

(6) 手術時にリンパ節への転移がなかった (node陰性) (n0) 乳癌において、術後予後予測に関与する予後の悪い群で高発現する以下から選ばれる遺伝子；

25 AF058701/ DNA polymerase zeta catalytic subunit (REV3) 、

AI066764/ lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1)、

x15940/ ribosomal protein L31.。

(7) 手術時にリンパ節への転移がなかった (node陰性) (n0) 乳癌において、

術後予後予測に関与する予後の良い群で高発現する以下から選ばれる遺伝子；

Hs.94653/ neurochondrin(KIAA0607)、

M13436/ ovarian beta-A-inhibin、

Hs.5002/ copper chaperone for superoxide dismutase; CCS、

5 D67025/ proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 3、

M80469/ MHC class I HLA-J gene、

Hs.4864/ ESTs、

Hs.106326/ ESTs。

(8) エストロゲンレセプター陰性の乳癌において、術後予後予測に関与する

10 以下の配列より選ばれる遺伝子；

Hs.108504/ FLJ20113/ ubiquitin-specific protease otubain 1

Hs.146550/ MYH9/ myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle

Hs.194691/ RAI3/ retinoic acid induced 3

Hs.1975/ TDRD3/ tudor domain containing 3

15 Hs.203952/ TRRAP/ transformation/transcription domain-associated protein

Hs.278607/ GSA7/ ubiquitin activating enzyme E1-like protein

Hs.429/ ATP5G3/

20 ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrialF0complex, subunitc (subunit9) isoform3

Hs.75305/ AIP/ aryl hydrocarbon receptor interacting protein

Hs.81170/ PIM1/ pim-1 oncogene

Hs.99987/ ERCC2/

25 excision repaircross-complementingrodentrepairdeficiency, complementationgroup2

Y12781/ Transducin (beta) like 1 protein

Hs.104417/ KIAA1205 protein

cl.21783/ Hypothetical protein

Hs.112628/ Hypothetical protein: MGC43581

Hs.170345/ Hypothetical protein FLJ13710

Hs.53996/ weakly similar to zinc finger protein 135

Hs.55422/ Hypothetical protein

5 Hs.112718/ EST

Hs.115880/ EST

Hs.126495/ EST

また本発明は、上記（８）の内、予後の悪い群で高発現する遺伝子である。

さらに本発明は、上記（１）～（８）のいずれかの遺伝子及び／又はそれら遺
10 伝子に特異的なプローブが搭載されたDNAマイクロアレイであり、好ましくは、
DNAマイクロアレイが繊維型マイクロアレイである。

前記遺伝子及び／又はそれら遺伝子に特異的なプローブは乳癌の術後予後の検
査方法においてマーカーとして使用することができる。さらには、乳癌の術後予
後を制御する癌治療薬のマーカーとしても使用することができる。また、前記マ
15 イクロアレイは乳癌の術後予後の検査方法において使用することができる。

さらに、本発明は、前記遺伝子及び／又はそれら遺伝子に特異的なプローブを
マーカーにして、乳癌の術後予後を制御する癌治療薬のスクリーニング方法であ
る。前記スクリーニング方法には、前記マイクロアレイを使用することができる。

また、当該マーカーは試薬として包含することができ、乳癌の術後予後の診断
20 キットとして使用することができる。当該試薬キットにはマーカーが搭載された
DNAマイクロアレイ、好ましくは繊維型マイクロアレイを包含する。

本発明の手法により、完全に新規の乳癌関連遺伝子を見出すと同時に、それら
の遺伝子が乳癌の悪性化に深く関与し、最終的には乳癌患者の予後に影響を及ぼ
していることを発見した。さらには見出された遺伝子の発現状態を評価する数式
25 を構築することにより、まったく新規かつ有効な乳癌術後予後予測システムを開
発した。癌が遺伝子の異常による疾患であることを考慮すると、遺伝子発現の観
点から見た本発明のシステムは従来の予後評価法とはまったく異なる、癌の生物
学的本質を捉えた画期的な予後予測システムであると考えられる。

図面の簡単な説明

図 1 は、5y-Sグループに比べて5y-Dグループで発現が上昇した遺伝子群 (A) と減少した遺伝子群 (B) を示す写真である。

- 5 図 2 は、5y-Sグループと5y-Dグループ由来のRNAの半定量RT-PCRの分析結果を示す写真である。

図 3 は、個々の患者における予後スコアを示す。

図 4 は、5Y-Fグループと5Y-Rグループ由来のRNAについての半定量RT-PCRの分析結果を示す写真である。

- 10 図 5 は、5Y-Fグループと5Y-Rグループ由来のRNAについての半定量RT-PCRの分析結果を示す写真である。

図 6 は、個々の患者の予後スコアを示す。

図 7 は、5S腫瘍において高発現する 7 遺伝子の半定量PCRの分析結果を示す写真である。

- 15 M：マーカーラダー (Marker ladder)

S1-S10：手術後5年以上の間無病生存した患者の新たに検査した組織である。

D1-D10：手術後5年以内に乳癌で死亡した患者を新たに検査したケースである。発現強度の違いはStudent's t-テストで評価した；p値が0.05以下の場合、統計的に有意であると考えられる。

- 20 図 8 は、5Dグループで高発現する3遺伝子の半定量PCRの分析結果を示す写真である。符号の説明は図 7 の説明を参照。

図 9 は、新たに調べた20ケースの予後指標 (PI) を描図した結果である。5年以上の間無病生存した全10人の患者の指標は7より高かった。一方、手術後5年以内に乳癌で死亡した患者の指標は7より低かった。2つのグループの分配は統計学

- 25 的に有意である ($p = 0.0002$)

発明を実施するための最良の形態

本発明の一つの態様である乳癌の術後予後予測に関与するマーカー遺伝子群は、

エストロゲンレセプター陰性乳癌、node陰性乳癌及び原発性乳癌において、外科手術後5年以内に死亡あるいは再発した患者、及び5年以上の間生存した患者からの遺伝子の発現機能をcDNAマイクロアレイで分析することにより得られたものである。

5 具体的には、本発明の態様の一つは、乳癌の術後予後予測に関与する既知配列から選ばれる以下の定義の少なくとも1よりなる遺伝子である；

1) エストロゲンレセプター陰性の乳癌において、外科手術後5年以内に死亡した乳癌患者からの遺伝子（5y-Dグループ）と数年以上無病（disease-free）生存した患者からの遺伝子（5y-Sグループ）とが、その発現機能によって区別することができたマーカー遺伝子群。

10 2) 手術時にリンパ節への転移がなかった（node陰性）（n0）乳癌において、手術後5年以内に再発したn0乳癌患者からの遺伝子（5Y-Rグループ）と5年以上の間無病生存した患者からの遺伝子（5Y-Fグループ）とが、その発現機能によって区別することができたマーカー遺伝子群。

15 3) 原発性乳癌において、外科手術後5年以内に死亡した乳癌患者からの遺伝子（5Dグループ）と数年以上無病生存した患者からの遺伝子（5Sグループ）とが、その発現機能によって区別することができたマーカー遺伝子群。

本発明の乳癌の術後予後予測に関与する遺伝子は、Random-permutationテスト、Mann-Whitneyテストを用いてcDNAマイクロアレイのデータを評価することにより得られたものである。本発明は遺伝子発現機能をcDNAマイクロアレイと半定量PCR実験とを組み合わせることで評価することにより、臨床レベルにおいてより役立つアプローチを提示する。

本発明では、乳癌患者の遺伝子発現機能を評価することにより、原発性乳癌の術後予後予測に関与する遺伝子を同定した。

25 具体的には、本発明の態様の一つは原発性乳癌の術後予後予測に関与する既知配列から選ばれる以下の配列より選ばれる遺伝子である；

pro-alpha-1 type 3 collagen (PIIIP)、
complement component C1r、

dihydropyrimidinase-like 3 (DPYSL3)、
protein tyrosine kinase 9-like (PTK9L)、
carboxypeptidase E (CPE)、
alpha-tubulin、
5 beta-tubulin、
heat shock protein HSP 90-alpha gene、
malate dehydrogenase、
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 3 (NDUFB3)。

10 本発明において「高発現」とは、対象遺伝子の発現量が、母集団における同遺伝子の発現量の平均値と比較したときに、当該平均値よりも高いこと、例えば2倍以上であることを意味する。

また、本発明において「低発現」とは、対象遺伝子の発現量が、母集団における同遺伝子の発現量の平均値と比較したときに、当該平均値よりも低いこと、例え
15 ば2倍以下であることを意味する。

上記の遺伝子のいくつかは腫瘍細胞の増殖又は遠隔転移に関連していると考えられる。例えば、heat shock protein HSP 90-alphaは、多くのキナーゼのシャペロンであり、癌細胞の成長を促進する可能性がある (Neckers, L. (2002) Trends Mol Med 8, S55-61.)。malate dehydrogenaseは、好気性及び嫌気性代謝に伴うエネルギーに関連する重要な酵素であり、malate dehydrogenaseの活性は扁平上皮癌の腫瘍マーカーに関連する (Ross, C.D., et al. (2000) Otolaryngol Head Neck Surg 122, 195-200.)。NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 3 (NDUFB3)はミトコンドリアの電子伝達系に属しており、乳癌細胞株であるMDA-MB-231においてNDUFB3を含む領域の染色体異常が顕著である (Xie, D., et al. (2002) Int J
20 Oncol 21, 499-507.)。

上記の原発性乳癌の術後予後予測に関与する10遺伝子は予後の良い群 (5Sグループ) と予後の悪い群 (5Yグループ) とで異なる発現を示し、10遺伝子のうち7遺伝子は予後の良い群 (5Sグループ) で高発現する遺伝子である。

すなわち、本発明の態様の一つは、原発性乳癌の術後予後予測に關与する既知配列から選ばれる予後の良い群で高発現する以下から選ばれる遺伝子である；

pro-alpha-1 type 3 collagen (PIIP)、
complement component C1r、
5 dihydropyrimidinase-like 3 (DPYSL3)、
protein tyrosine kinase 9-like (PTK9L)、
carboxypeptidase E (CPE)、
alpha-tubulin、
beta-tubulin。

10

上記の原発性乳癌の術後予後予測に關与する10遺伝子のうち3遺伝子は予後の悪い群（5Yグループ）で高発現する遺伝子である。すなわち、本発明の態様の一つは、原発性乳癌の術後予後予測に關与する既知配列から選ばれる予後の悪い群で高発現する以下から選ばれる遺伝子である；

15

heat shock protein HSP 90-alpha gene、
malate dehydrogenase、
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 3 (NDUFB3)。

20

ここで、原発性乳癌の予測指標(PI)を以下のように定義し、乳癌の術後予後予測に用いることができる；

予測指標(PI)＝（乳癌組織における上記の予後の良い群で高発現する7遺伝子の正規化した発現比率の合計）－（乳癌組織における上記の予後の悪い群で高発現する3遺伝子の正規化した発現比率の合計）。

25

本発明では、乳癌患者の遺伝子発現機能を評価し、node陰性乳癌の術後予後予測に關与する10遺伝子を同定した。

具体的には、本発明の一つの態様は、手術時にリンパ節への転移がなかった（node陰性）（n0）乳癌において、術後予後予測に關与する既知配列から選ばれる以下の配列より選ばれる遺伝子である；

- AF058701/ DNA polymerase zeta catalytic subunit (REV3) 、
 AI066764/ lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1)、
 x15940/ ribosomal protein L31、
 Hs.94653/ neurochondrin(KIAA0607)、
 5 M13436/ ovarian beta-A-inhibin、
 Hs.5002/ copper chaperone for superoxide dismutase; CCS、
 D67025/ proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 3、
 M80469/ MHC class I HLA-J gene、
 Hs.4864/ ESTs、
 10 Hs.106326/ ESTs。

上記のnode陰性乳癌の術後予後予測に関与する遺伝子には腫瘍細胞の増殖、遠隔転移に関与する遺伝子が含まれる。例えば、galectin 1は細胞分化を制御するオートクライン型癌抑制因子である (AxelH, et al. (2003) Int. J. Cancer, 103: 370-379.)。また、癌転移を活性化する遺伝子が含まれる。

上記のnode陰性乳癌の術後予後予測に関与する10遺伝子は予後の良い群 (5Y-Fグループ) と予後の悪い群 (5Y-Rグループ) とで異なる発現を示し、10遺伝子のうち3遺伝子は予後の悪い群 (5Y-Rグループ) で高発現する遺伝子である。すなわち、本発明の一つの態様は手術時にnode陰性乳癌において、術後予後予測に関与する既知配列から選ばれる予後の悪い群で高発現する以下から選ばれる遺伝子である；

- AF058701/ DNA polymerase zeta catalytic subunit (REV3) 、
 AI066764/ lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1)、
 x15940/ ribosomal protein L31。

25 上記のnode陰性乳癌の術後予後予測に関与する10遺伝子のうち7遺伝子は予後の良い群 (5Y-Fグループ) で高発現する遺伝子である。すなわち、本発明の一つの態様はnode陰性乳癌において、術後予後予測に関与する既知配列から選ばれる予後の良い群で高発現する以下から選ばれる遺伝子である；

Hs.94653/ neurochondrin(KIAA0607)、
 M13436/ ovarian beta-A-inhibin、
 Hs.5002/ copper chaperone for superoxide dismutase; CCS、
 D67025/ proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 3、
 5 M80469/ MHC class I HLA-J gene、
 Hs.4864/ ESTs、
 Hs.106326/ ESTs。

ここで、node陰性乳癌の予後スコア(PS)を以下のように定義し、乳癌の術後予後予測に用いることができる；

- 10 予後スコア(PS)=(乳癌組織における上記の予後の悪い群で高発現する3遺伝子の正規化した発現比率の合計)－(乳癌組織における上記の予後の良い群で高発現する7遺伝子の正規化した発現比率の合計)。

本発明では、乳癌患者の遺伝子発現機能を評価することにより、エストロゲンレセプター陰性の乳癌の術後予後予測に関与する20遺伝子を同定した。

- 15 具体的には、本発明の一つの態様は、エストロゲンレセプター陰性の乳癌において、術後予後予測に関与する既知配列から選ばれる以下の配列より選ばれる遺伝子である；

- Hs.108504/ FLJ20113/ ubiquitin-specific protease otubain 1
 Hs.146550/ MYH9/ myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle
 20 Hs.194691/ RAI3/ retinoic acid induced 3
 Hs.1975/ TDRD3/ tudor domain containing 3
 Hs.203952/ TRRAP/ transformation/transcription domain-associated protein
 Hs.278607/ GSA7/ ubiquitin activating enzyme E1-like protein
 25 Hs.429/ ATP5G3/ ATPsynthase, H⁺-transporting, mitochondrialF0complex, subunitc(subunit 9) isoform 3
 Hs.75305/ AIP/ aryl hydrocarbon receptor interacting protein
 Hs.81170/ PIM1/ pim-1 oncogene

Hs.99987/ ERCC2/

excisionrepaircross-complementingrodentrepairdeficiency,complementationgroup2

Y12781/ Transducin (beta) like 1 protein

5 Hs.104417/ KIAA1205 protein

cl.21783/ Hypothetical protein

Hs.112628/ Hypothetical protein: MGC43581

Hs.170345/ Hypothetical protein FLJ13710

Hs.53996/ weakly similar to zinc finger protein 135

10 Hs.55422/ Hypothetical protein

Hs.112718/ EST

Hs.115880/ EST

Hs.126495/ EST。

上記のエストロゲンレセプター陰性乳癌の術後予後予測に關与する遺伝子には
 15 腫瘍細胞の増殖又は遠隔転移に關連する遺伝子が含まれる。例えば、PIM1はセリン/スレオニンキナーゼであり、前立腺がんの臨床結果とその発現には相関性がある（Oesterreich,S., et al.(1996) Clin Cancer Res, 2, 1199-1206.）。また、TRRAP蛋白質は哺乳類HAT複合体のサブユニットであり、TRRAPのアンチセンスRNAは乳癌細胞のエストロゲン依存性の成長を阻害する。

20 上記のエストロゲンレセプター陰性乳癌の術後予後予測に關与する20遺伝子は、予後の悪い群（5y-Dグループ）で高発現する。すなわち、本発明の一つの態様は、予後の悪い群で高発現する、前記のエストロゲンレセプターに対して陰性の乳癌において、術後予後予測に關与する既知配列から選ばれる遺伝子である。

ここで、上記のエストロゲンレセプター陰性乳癌の術後予後予測に關与する遺
 25 伝子の発現に基づいて、以下のように乳癌の術後予後を予測することができる；

（1）上記のエストロゲンレセプター陰性乳癌の術後予後予測に關与する20遺伝子の乳癌組織における発現量を母集団における平均値と比較し、各遺伝子発現量が母集団の平均値の2倍以上であるならば、1点を付与、

(2) (1) の操作を各20遺伝子について行い、合計点数が8点以上ならば、予後不良とする。

上記の乳癌の術後予後予測に関連する遺伝子は、マーカーとして乳癌の術後予後の検査に用いることができる。すなわち、本発明の一つの態様は、前記遺伝子をマーカーにする乳癌の術後予後の検査方法である。

上記の乳癌の術後予後予測に関連する遺伝子は、マーカーとして乳癌の術後予後を制御する癌治療薬のスクリーニングに用いることができる。すなわち、本発明の一つの態様は、前記の遺伝子をマーカーにする乳癌の術後予後を制御する癌治療薬のスクリーニング方法である。

上記の乳癌の術後予後予測に関連する遺伝子は、マーカーとして乳癌の術後予後の診断に用いることができる。また、上記遺伝子に対して特異的なプローブを設計し、それらプローブをマーカーとして使用することもできる。それらプローブは例えば、ダイナコム社製 Probe Quest (登録商標) により設計することが可能である。すなわち、本発明の一つの態様は、前記の遺伝子をマーカーにする試薬を含む乳癌の術後予後の診断キットである。

上記の診断キットはマイクロアレイを包含することができる。すなわち、本発明の一つの態様は、前記診断キットがマイクロアレイを包含するものである診断キットである。

上記マイクロアレイを包含するものである診断キットのマイクロアレイには繊維型マイクロアレイが含まれる。ここで、繊維型マイクロアレイの調製方法については、前記特許文献6-7を引用する。すなわち、本発明の一つの態様は、マイクロアレイが繊維型マイクロアレイである前記診断キットである。

次に、実施例により本発明の実施の態様を具体的に説明するが、本発明は実施例に限定されるものではない。

実施例 1

エストロゲンレセプター陰性乳癌における術後予後予測の遺伝子発現機能の

評価

(組織サンプル)

- 日本医科大学並びに癌研究会の倫理委員会より承認されたガイドラインに従ってインフォームドコンセントを得た後、癌研究会付属病院（東京）において
- 5 1995-1997年に手術を受けた乳癌患者から原発性乳癌及び隣接する正常乳腺からの組織を採取した。組織は速やかに凍結され、 -80°C で保存された。954人の患者について、その全員を5年以上の間あるいは死亡時まで臨床的に追跡し、手術後5年以内に死亡したエストロゲンレセプター陰性乳癌の患者10人（5y-D）、及び5年以上の間無病生存した患者10人（5y-S）から試料を選んだ。両方の患者グループの臨床のバックグラウンドは、年齢、リンパ節転移、腫瘍径と組織型において一致させた（表1）。
- 10

(乳癌の20症例の臨床的特徴)

表 1

グループ	ケースno.	ER状態	年齢	性別	径過 ^a	TNM	分類 ^b	TTD ^c
						腫瘍	リンパ節	
5y-D	3281	Negative	34	Female	a2	T2	N1b	9
	3459	Negative	64	Female	a2	T4	N3	6
	3550	Negative	73	Female	a2	T4	N1b	12
	3892	Negative	62	Female	a2	T2	N1a	21
	3948	Negative	60	Female	a2	T2	N1a	51
	4020	Negative	50	Female	a2	T2	N3	28
	3654	Negative	46	Female	a2	T4	N1b	19
	4118	Negative	53	Female	a2	T1	N1a	21
	4462	Negative	34	Female	a1	T2	N1a	24
	4126	Negative	51	Female	b5	T4	N3	6
5y-S	3656	Negative	31	Female	a2	T2	N1a	>60
	3197	Negative	42	Female	a1	T1	N1a	>60
	3662	Negative	58	Female	a2	T2	N0	>60
	3241	Negative	47	Female	a2	T2	N1a	>60
	3267	Negative	51	Female	a2	T2	N1a	>60
	3329	Negative	60	Female	a2	T2	N1a	>60
	3345	Negative	43	Female	a1	T2	N2	>60
	3556	Negative	59	Female	a2	T3	N0	>60
	3558	Negative	57	Female	a2	T3	N1b	>60
	3658	Negative	42	Female	a1	T2	N1a	>60

^aa1: invasive papillotubular carcinoma. a2: invasive solid-tubular carcinoma. b5: squamous cell carcinoma.

^bTNM分類。日本乳癌学会による臨床学的分類。

^cTTD:手術後に死亡するまでの時間(time to death after surgery)(月)

- すべての患者は癌研究会付属病院の「乳癌のための手術後の臨床のプロトコル」に従って手術後のアジュバント治療を受けた。各症例でのアジュバント治療の選択は、外科手術のタイプ、リンパ節関与の状態、及び局所あるいは遠隔転移の存在に基づいて厳密に決定した。本発明の研究においては、患者のいずれもがアジュバント化学療法の前に遠隔転移を持っておらず、外科手術の前に放射線療法あるいは化学療法を受けていなかった。

(臨床病理 (Clinicopathological) パラメータ)

- 次のパラメータを調べた：組織型、腫瘍径及び浸潤 (t因子)、リンパ節関与 (lymph node involvement)、及びエストロゲンレセプター (ER) とプロゲステロンレセプター (PgR) の状態。腫瘍をTNM分類と日本の乳癌学会 (1989) の組織分類によって、次のタイプに分類した；noninvasivetubular (1a)、invasive papillotubular (a1)、invasive solid-tubular (a2)、invasivescirrhouscarinoma (a3)、及び他の特別なタイプ (b)。分類は基本的に世界保健機構の乳癌組織分類と同じである。t 因子は、組織学的TNM分類に従って次のタイプに分類した；最大寸法が2 c m以下の腫瘍 (t1)、皮膚又は胸筋への浸潤のない、最大寸法が2 c m以上の腫瘍 (t2)、皮膚あるいは胸筋への浸潤のあるもの (t3)。

(cDNAマイクロアレイのデザインと構成)

- UniGene データベースから選択した25,344の cDNAsにより、“ゲノムワイド cDNA マイクロアレイ”を構築した。当該cDNAsは種々のヒト器官から分離された poly(A)+RNA を使い RT-PCR で作成された。PCR 産物を、ArraySpotter Generation III (Amersham Biosciences) を使ってタイプ7のスライド・ガラス (AmershamBiosciences UK Limited、Buckinghamshire、UK) にスポットした。各スライドは、384のハウスキーピング遺伝子を含む。

(RNAの調製及び増幅)

腫瘍原料を採取後直ちに-80℃で急速凍結した。RNAを、TRIzol (Invitrogen Inc.、

Carlsbad, CA, USA) を使って抽出し、さらに RNeasykits (Quiagen Inc., Valencia, CA) を使って精製した。各 RNA の純度を、分光測光法及び 1.2% 変性ホルムアミドゲル上で電気泳動することにより評価した。高純度 RNA は、1.8-2.0 の吸光度比 (260nm/280nm) を持ち、ホルムアミドゲル電気泳動上で 28S/18S リボゾーマルバンドが 1.8 以上の比率を有するサンプルとして定義した。1 ユニットの DNaseI (Epicentre Technologies, Madison, WI) (1 unit/ μ l) で処理後、出発原料として各試料から RNA の 2 μ g を用いて T7 RNA ポリメラーゼによる RNA 増幅を行った。増幅を 2 回行い、RNeasykits (Quiagen Inc., Valencia, CA) で、増幅された RNA (aRNA) を精製した。各 aRNA の量を分光光度計により測定し、その品質をホルムアミドゲル電気泳動によりチェックした。

(aRNA の標識、ハイブリダイゼーション及びスキャニング)

マイクロアレイ分析の cDNA を、aRNA から調製した。乳癌及び正常乳腺組織からの aRNA (5~10 μ g) を、aminoallyl-cDNA labelingkits (Ambion, Austin, TX) を使い Cy5 (癌試料) と Cy3 (正常試料) で標識した。Cy3-と Cy5-標識 cDNA プローブを混合し、95℃ で 5 分加熱した後、30 秒氷で急冷し、マイクロアレイにハイブリダイゼーションさせた。混合されたプローブを、microarray hybridization solution version 2 (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, UK) を 50% 終濃度のホルムアミド (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) に添加した。15 時間 40℃ でのハイブリダイゼーションの後に、マイクロアレイスライドを、最初に 1xSSC と 0.2% SDS によって、10 分間 55℃ で洗浄し、次いで 2 回 0.1xSSC/0.2% SDS で各 1 分間室温で洗浄した。全ての処理は、Automated Slide Processor System (Amersham) で行った。各ハイブリダイゼーションのシグナル強度を、Gene Pix 4000A (Axon Instruments, Inc., Foster City, CA, USA) でスキャニングし、Gene Pix 3.0 (Axon Instruments) で分光測光法により評価した。スキャンされたシグナルを、以下の文献記載の方法 (the total gene normalization method) で正規化した (Yang YH, Dudoit S, Luu P, et al. (2002) Nucleic Acids Res 30, e15; Manos EJ, Jones DA. (2001) Cancer Res 61: 433-438)。

(シグナル分析及び異なる発現を示す遺伝子の選択)

各ハイブリダイゼーションのシグナル強度を、Gene Pix Pro 3.0 (Axon Instruments, Inc., Foster City, CA, USA) により測光法で評価した。癌とコントロール間のmRNA発現量を正規化するために、各遺伝子発現のCy5 : Cy3比率を調整した。その結果、ハウスキーピング遺伝子の平均化されたLog (Cy5 : Cy3比率) はゼロであった。27個のハウスキーピング遺伝子は、Webサイト <http://www.nhgri.nih.gov/DIR/LCG/ARRAY/expn.html> のハウスキーピングパネルから援用した。各マイクロアレイスライドについて、(S/N) 比のカットオフ値を3.0に設定した。そして、Cy3とCy5のシグナル強度が、カットオフ値より低い遺伝子は検討から除外した。

(Mann-Whitney テスト)

5y-Dと5y-S腫瘍間で、明らかに異なる発現を示した遺伝子を検討するために、Mann-Whitneyテストを、一連のサンプルXに適用した。Xは、各遺伝子及び各サンプルのCy5/Cy3シグナル強度比率である (OnoK, Tanaka T, Tsunoda T, et al. (2000) Cancer Res 2000; 60: 5007-5011)。U値を、両グループの少なくとも5サンプルで有意なシグナルを与えた各遺伝子について計算した。U値が23より低いか、あるいは77より大きい遺伝子を選択した。U値は、各X値に基づく各遺伝子の、5y-Dグループに対する5y-Sグループを計算しているもので、23より低いU値は、5y-Dグループに比べ5y-Sグループにおいて高発現するものと評価した。しかしながら、77より大きなU値を持つ遺伝子は、5y-Sグループに比べ5y-Dグループにおいて高発現するものと評価した。この基準によると、183遺伝子が5y-Sグループで高発現しており、31遺伝子が5y-Sグループで高発現していた。したがって、2つのグループ間での中間発現値が2倍以上の差異を示す遺伝子のみを ($\mu_{XD}/\mu_{XS} \leq 0.5$ あるいは ≥ 2.0 、 μ_{XD} と μ_{XS} がそれぞれ5y-Dあるいは5y-Sグループの平均X値を示す) 予後関連の遺伝子と定義した。その結果、全部で110遺伝子が選ばれた。そのうち90遺伝子が5y-D腫瘍群で高いレベルで発現しており、20遺伝子が

5y-S腫瘍群で高いレベルで発現していた。

(Random-permutationテスト)

さらにMann-Whitneyテストによって選択された110遺伝子の価値を評価するために、permutationテストを行った。そしてグループ差異に関連する遺伝子の可能性、 P_s 、もまた想定した。各遺伝子を、発現ベクター $v(g) = (X_1, X_2, \dots, X_{20})$ (X_i は最初のサンプル群における i 番目のサンプルの遺伝子発現レベルを示す) で表すとき、理想的発現パターンは $c = (c_1, c_2, \dots, c_{20})$ (i 番目のサンプルがS又はDグループに属するかにより $c_i = +1$ 又は 0 となる) で表現される。

- 10 遺伝子とグループ差異 P_{gc} 間の相関は、次のように定義された：すなわち、 $P_{gc} = (\mu_s - \mu_D) / (\delta_s + \delta_D)$; μ_s (μ_D) と δ_s (δ_D) は、新規に定義されたS (又はD) グループにおいて、各サンプルの該遺伝子“ g ”の $\log_2 X$ の標準偏差を示す。

- 15 permutationテストは、 c の座標を入れ換えることにより行った。すべてのpermutation間で相関値、 P_{gc} を計算した。これらの手順は10000回にわたり繰り返し行った。偶然に、2つのグループを分類する遺伝子の可能性を示す p 値が、選択された110遺伝子の各々について評価された。最終的に、5y-Dケースで高発現する71遺伝子と、5y-Sケースで低発現する15遺伝子を選別した。

20 (半定量(Semi-quantitative)RT-PCR)

- RNA ($2 \mu g$) を、DNase I (Epicentre Technologies, Madison, WI, USA) で処理し、Reverscript II reverse transcriptase (和光純薬(株)、大阪、日本) とオリゴ(dT) 12-18プライマーを使って単鎖 cDNA を逆転写させた。単鎖 cDNAs は、量的なコントロールとして GAPD (glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase) の
- 25 発現をモニタリングすることにより次のPCR増幅のために濃度調整を行った。各PCRは、Gene Amp PCRシステム9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を使い $1 \times$ PCRバッファ $30 \mu l$ 量で、以下の反応条件で行った；
94°C 5分、

(94℃ 30秒、60℃ 30秒、及び72℃ 30分)を25-35サイクル。

RT-PCRに使ったプライマー配列は以下である:

- | | |
|-----------|--|
| 配列番号1 | GAPD (control) forward, 5'-GGA AGGTGA AGG TCG GAG T-3' |
| 配列番号2 | reverse, 5'-TGG GTG GAA TCA TAT TGGAA-3'; |
| 5 配列番号3 | Hs.108504F, 5'-ACA CTT CAT CTG CTCCCT CAT AG-3'; |
| 配列番号4 | Hs.108504R, 5'-CTG CCT AGA CCT GAGGAC TGT AG-3'; |
| 配列番号5 | Hs.146550F, 5'-ACT GAG GCC TTT TGGTAG TCG-3'; |
| 配列番号6 | Hs.146550R, 5'-TCT CTT TAT TGT GATGCT CAG TGG-3'; |
| 配列番号7 | Hs.76607F, 5'-AAA TCC TTC TCG TGT GTTGAC TG-3'; |
| 10 配列番号8 | Hs.76607R, 5'-CAG TCA TGA GGG CTA AAAACT GA-3'; |
| 配列番号9 | Hs.1975F, 5'-GAA GAC AAC AAG TTT TAC CGG G-3'; |
| 配列番号10 | Hs.1975R, 5'-ATG GTT TTA TTG ACG GCAGAA G-3'; |
| 配列番号11 | Hs.203952F, 5'-AGG ACA CGT CCT CTCCTC TCT C-3'; |
| 配列番号12 | Hs.203952R, 5'-TAA AGC TAG CGA AGGAAC GTA CA-3'; |
| 15 配列番号13 | Hs.278607F, 5'-TCC CTT CTG TTT CCT CAG TGT T-3'; |
| 配列番号14 | Hs.278607R, 5'-CCT GCC CCG ATA AAA ATA TCT AC -3'; |
| 配列番号15 | Hs.429F, 5'-TTG ACC TTA AGC CTC TTTTCC TC-3'; |
| 配列番号16 | Hs.429R, 5'-ATA ACG TAC ATT CCC ATGACA CC-3'; |
| 配列番号17 | Hs.75305F, 5'-ACT TTC AAG ATG GGACCA AGG-3'; |
| 20 配列番号18 | Hs.75305R, 5'-ATA TAC ACA GAA GCATGA CGC AG-3'; |
| 配列番号19 | Hs.81170F, 5'-TTG CTG GAC TCT GAAATA TCC C-3'; |
| 配列番号20 | Hs.81170R, 5'-TTC CCC TGT ACA GTATTT CAC TCA-3'; |
| 配列番号21 | Hs.99987F, 5'-CTG AGC AAT CTG CTCTAT CCT CT-3'; |
| 配列番号22 | Hs.99987R, 5'-GTT CCA GAT TCG TGAGAA TGA CT-3'; |
| 25 配列番号23 | Y12781F, 5'-ACC AGT AAC AAC TGT GGGATG G-3'; |
| 配列番号24 | Y12781R, 5'-CAA ATG AGC TAC AAC ACACAA GG-3'; |
| 配列番号25 | Hs.104417F, 5'-CCC CCT CCA CCT TGTACA TAA T-3'; |
| 配列番号26 | Hs.104417R, 5'-GTT TTC GTT TGG CTGGTT GTG-3'; |

- 配列番号27 cl.21783F, 5'GTC TGA GAT TTT ACTGCA CCG-3';
 配列番号28 cl.21783R, 5'GGA TGG AGC TGG AGGATA TTA-3';
 配列番号29 Hs.112628F, 5'ATT GCT AAG GAT AAGTGC TGC TC-3';
 配列番号30 Hs.112628R, 5'TGT CAG TAT AGA AGCCTG TGG GT-3';
 5 配列番号31 Hs.170345F, 5'TTC TTA GGC CAT CCCTTT TCT AC-3';
 配列番号32 Hs.170345R, 5'GCA TCT GAA TGT CTTTCT CCC TA-3';
 配列番号33 Hs.53996F, 5'CCA TAG GAT CTT GACTCC AAC AG-3';
 配列番号34 Hs.53996R, 5'ACT GGG AGT GGA GGAAAT TAG AG-3';
 配列番号35 Hs.55422F, 5'CTA ATG TAA GCT CCATTG GGA TG-3';
 10 配列番号36 Hs.55422R, 5'CAA ACT GCA AAC TAGCTC CCT AA-3';
 配列番号37 Hs.112718F, 5'AAG ACT AAG AGG GAA AAT GTG GG-3';
 配列番号38 Hs.112718R, 5'AGG TAA CCC AAA GTG ACA AAC CT-3';
 配列番号39 Hs.115880F, 5'TTA AGT GAG TCT CCT TGG CTG AG-3';
 配列番号40 Hs.115880R, 5'AGG GCC CCT ATA TCC AAT ACC TA-3';
 15 配列番号41 Hs.126495F, 5'GAT CTT TCA AGA TGAGCC AAG GT-3';
 配列番号42 Hs.126495R, 5'AGT CAT TCA GAA GCCATT GAG AC-3'

(RT-PCR産物のシグナル強度測定と予後スコアの計算)

- PCR産物を、2%のアガロースゲル電気泳動とエチジウムブロマイド染色によ
 20 って検出した。ゲルをSpot Density法でデジタル画像処理システム (AlphaImager
 3300 ; Alpha Innotech、San Leandro、CA、USA) でスキャンした。各バンドの2
 次元領域を構築し、その密度をIDV (IntegratedDensity Value) と定義したピクセル
 強度(遺伝子発現)を得た。各グループにおけるIDVの差異の重要性を、Student's
 t-テストで評価した。その結果、t-テストで0.05以下のp値を示した20遺伝子を候
 25 補として選択した (表2) ; すなわち、当該20遺伝子の発現レベルは、5y-Dグル
 ープにおいて5y-Sグループに対して有意に高値であった。この情報を用いて、本
 発明者らは術後予後を予測するスコアリングシステムの確立を試みた。その際、
 各遺伝子は、各サンプルの発現レベルが20サンプルの平均発現レベルより高いか

否かにより決定した。もしサンプルの発現レベルが、平均の2倍以上であるならば、付加的に+1点を与えた。次に各サンプルのために全票（予後スコア）を得るためにすべての20遺伝子の点を合計した。その結果、8点以上のサンプルの場合は、悪い予後の表示と評価した。他方、8点以下の場合は、好ましい予後を表示していると評価した。

（予後スコアリングシステムの20候補遺伝子）

表 2

Hs./Accession No.	種類
Hs.108604	FLJ20113: ubiquitin-specific protease otubain 1
Hs.146650	MYH9: myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle
Hs.194691	RAI3: retinoic acid induced 3
Hs.1975	TD RD3: tudor domain containing 3
Hs.203952	TR RAP: transformation/transcription domain-associated protein
Hs.278607	GSA7: ubiquitin activating enzyme E1-like protein
Hs.429	ATP5G3: ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c (subunit 9) isoform 3
Hs.75305	AIP: aryl hydrocarbon receptor interacting protein
Hs.81170	PIM1: pim-1 oncogene
Hs.99987	ERCC2: excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2
Y12781	Transducin (beta) like 1 protein
Hs.104417	KIAA1205 protein
cl.21783	Hypothetical protein
Hs.112628	Hypothetical protein: MGC43681
Hs.170345	Hypothetical protein FLJ13710
Hs.53996	weakly similar to zinc finger protein 135
Hs.55422	Hypothetical protein
Hs.112718	EST
Hs.115880	EST
Hs.126495	EST

10

（結果）

エストロゲンレセプター陰性乳癌組織で、有意に高発現している257遺伝子を明らかにし、同様に低発現している378遺伝子を明らかにした。5y-Dと5y-Sグループ間で異なる発現を示す遺伝子を同定するために、マイクロアレイのデータを、

15

Mann-WhitneyテストとRandom-permutationテストにより分析した。その結果、5y-D腫瘍において全71遺伝子（10 EST と仮想タンパク質をコードしている9遺伝子を含む）が、共通して高発現のグループに分類された。これに対して、15遺伝子（3ESTを含む）が共通して低発現のグループに分類された（図1）。

5y-Dグループで高発現する遺伝子は、癌細胞の増殖及び転移に関与する以下の

遺伝子を含む；matrix metalloproteinase 2 (MMP2)、heatshock protein 27 (HSPB1、Pim-1 oncogene (PIM1) 及びtransformation/transcription domain-associated protein (TRRAP)。

5y-Dグループで低発現する遺伝子は、HLA-C (major histocompatibility complex, class I, C) 及び特異的なキナーゼの遺伝子を含む。DNA修復、転写、シグナル伝達、細胞骨格及び接着性と関係がある多くの遺伝子が、2つのグループ間で異なる発現を示した。

マイクロアレイのデータの信頼性を確かめるために、5y-Dグループで高発現する20遺伝子を選び (Hs.108504、Hs.146550、Hs.194691、Hs.1975、Hs.203952、
10 Hs.278607、Hs.429、Hs.75305、Hs.81170、Hs.99987、Y12781、Hs.104417、cl.21783、Hs.112628、Hs.170345、Hs.53996、Hs.55422、Hs.112718、Hs.115880 及びHs.126495)、半定量RT-PCRによって該遺伝子の発現レベルを調べた。その結果はマイクロアレイのデータと一致し、5y-Dと5y-Sグループを区別するための統計学的な意義を有していた (代表的なデータを図2で示す)。

15 マーカー遺伝子の発現プロファイルを使って、手術後の予後を予測するスコアリングシステムを構築するために、前述の方法で予後スコアを計算した。簡略には、マーカー遺伝子が次の基準に従って選択された；

(1) 調べた症例の少なくとも60%でカットオフレベルより高いシグナル強度を示す；

20 (2) $|\mu_D - \mu_S|$ が1.0以下である。ここで μ_D (μ_S) は、5y-D (5y-S) のケースでの対数変換相対発現比率から導かれる平均値を示す。

次に、発現機能により5y-Dグループと5y-Sグループとを区別することができたマーカー遺伝子を同定するためにMann-WhitneyテストとRandom-permutationテストを行った。関連するマイクロアレイの結果を、半定量
25 RT-PCR実験により確認した。Student's t-テストにより、20遺伝子を予後マーカーとして選別した (表2)。

本発明の予後スコア (PS) により、20人の患者を、予後不良と予測される10人 (PSが11以上) と、予後良好と予測される10人 (PSが11未満) に分けた。その結

果、手術後の経過との対比により、本発明のスコアリングシステムは5y-Dケースでは80%、5y-Sケースでは100%の正確さにおいて信頼性があることを示した（図3 A）。

5 本発明の予後スコアリングシステムを使い、追加5症例について調べた（図3 B）。当該システムは、2ケース（PS > 11；患者TD-1、及びTD-2）で不良予後を、3ケース（PS < 11；患者TD-3、TS-1、及びTS-2）で良好予後を予測した。その結果、当該スコアリングシステムは、これら5症例の実際の臨床結果に関して80%の正確性であった。

10 実施例 2

node陰性の乳癌における術後予後予測の遺伝子発現機能の評価
（組織サンプル）

15 組織サンプルは実施例 1 で記述した手法と同様に採取した。手術後5年以内に再発したnode陰性（n0）癌の患者（5Y-R）12人、及び5年以上の間無病生存した患者（5Y-F）12人からの腫瘍について、遺伝子発現を検討した。両方の患者グループの臨床バックグラウンドは、年齢、リンパ節転移、腫瘍径、ホルモン受容体の状態、及び病理組織において一致させた（表3）。フォローアップの中間期間は、7.8年、最初の手術と再発の間の平均期間は、5Y-Rグループで2.7年であった。尚、すべての患者は実施例 1 で記載したアジュバント治療を受けた。

20

(臨床病理データ)

表 3

ケース	年齢	更年期 状態	組織学的 ^a 分類	位置	径 (mm)	TNM 分類 ^b			ステージ	ER(+/-)	PgR(+/-)	D.F.I. ^c
						T	N	M				
R-1	55	Post.	a2	Rt.	25	2	1a	0	II	+	-	12m
R-2	50	Pre.	a3	Lt.	25	2	1a	0	II	+	+	16m
R-3	42	Pre.	a2	Rt.	25	2	0	0	II	+	+	49m
R-4	39	Pre.	a3	Rt.	35	2	0	0	II	+	-	20m
R-5	38	Pre.	a2	Lt.	30	2	0	0	II	+	+	52m
R-6	61	Post.	a3	Lt.	34	2	0	0	II	-	-	14m
R-7	54	Post.	b3	Lt.	30	2	0	0	II	-	-	24m
R-8	37	Pre.	a2	Rt.	23	2	0	0	II	-	-	25m
R-9	54	Post.	a3	Lt.	25	2	1a	0	II	+	+	47m
R-10	83	Post.	a2	Rt.	28	2	1a	0	II	+	+	38m
R-11	62	Post.	a2	Lt.	23	2	0	0	II	-	+	40m
R-12	50	Post.	a3	Lt.	35	2	0	0	II	-	-	25m
F-1	48	Pre.	a2	Lt.	18	2	0	0	II	+	+	8Y
F-2	62	Post.	a2	Rt.	25	2	0	0	II	+	-	8Y
F-3	57	Post.	a1	Rt.	20	1	0	0	I	+	+	7Y10m
F-4	61	Post.	a2	Lt.	30	2	1a	0	II	-	-	7Y2m
F-5	42	Pre.	a1	Lt.	12	1	1a	0	I	-	+	7Y11m
F-6	51	Pre.	a2	Rt.	28	2	1a	0	II	-	-	7Y10m
F-7	59	Post.	a2	Rt.	40	3	0	0	II	-	-	7Y5m
F-8	57	Post.*	a2	Rt.	45	3	1b	0	II	-	-	7Y5m
F-9	42	Pre.	a1	Lt.	48	2	1a	0	II	-	+	7Y3m
F-10	58	Post.	a2	Lt.	13	2	0	0	II	-	-	7Y3m
F-11	50	Post.	a2	Lt.	25	2	0	0	II	+	+	7Y8m
F-12	55	Post.	a1	Rt.	35	2	0	0	II	+	+	7Y5m

5 ^a : a1 : invasive papillotubular carcinoma、a2 : invasivesolid-tubularcarcinoma、
a3 : invasive schirrhous carcinoma

^b : TNM分類：日本乳癌学会のTNM分類に従って臨床学的に分類された

^c : D.F.I : 発病しない期間 (disease free interval)

10 (臨床病理 (Clinicopathological) パラメータ)

実施例 1 で記述した手法で臨床病理パラメータを調べた。組織学的グレードは、Elastonand Ellis (Abrams JS. Breast Cancer2001; 8: 298-304.) の方法により評価した。リンパ管浸潤は、欠如か陽性で評価した (例えば、癌周囲のリンパ管に癌細胞が一つ又はそれ以上存在する場合、陽性と評価した)。脂肪浸潤 (Fat invasion)

15 は、欠如か陽性かで評価した (例えば癌が、間質組織にまで浸潤している場合、陽性と評価した)。

(cDNAマイクロアレイの調製)

25,344の cDNAsを有する、“ゲノムワイド cDNAマイクロアレイキット
(Amersham Biosciences UK Limited、Buckinghamshire、UK)”を使用した。PCR
5 産物は、ArraySpotter Generation III (Amersham Biosciences) を使い、タイプ7
ガラススライド (AmershamBiosciences) 上にスポットした。

(RNAの調製と増幅)

実施例 1 で記述した手法と同様にRNAの調製と増幅を行った。

10

(aRNAの標識、ハイブリダイゼーション及びスキャニング)

実施例 1 で記述した手法と同様にaRNAのラベリング、ハイブリダイゼーション及びスキャニングを行った。

15 (Mann-Whitney テスト)

無病及び再発グループ間で異なる発現を示す遺伝子を同定するために、正規化したシグナルを、一連のXに適用されたMann-Whitneyテストにより分析した。ここでXは、各遺伝子と各試料についてのCy5/Cy3signal強度比である。2つのグループ間で、発現強度において2倍以上の差異を示す遺伝子を選んだ。3.0以下のシ
20 グナルーノイズ比の遺伝子は分析から除外した。

U値を、両グループの少なくとも5試料で有意のシグナルを与えた各遺伝子について計算した。37より低い或いは107より大きいU値を持つ遺伝子を選択した。U値は、各X値に基づき各遺伝子について5Y-Rグループに対する5Y-Fグループについて計算したので、37より低いU値を持つ遺伝子は、5Y-Rグループに比べて5Y-F
25 グループで、高発現すると判断した（第一カテゴリー）。一方、107より大きいU値を持つ遺伝子は、5Y-Fグループに比べて5Y-Rグループで、高発現すると判断された（第二カテゴリー）。

この方法で、第一カテゴリーで78遺伝子、第二カテゴリーで55遺伝子を同定し

た。そこで、2つのグループ間の中間発現値の2倍以上の差異を示したもののみを
 予後関連遺伝子と定義した ($\mu X_R / \mu X_F \leq 0.5$ あるいは ≥ 2.0 、ここで μX_R と μX_F
 は、各5Y-R又は5Y-Fグループの平均的X値を示す)。全部で、98遺伝子が選ばれ、
 そのうち64遺伝子が5Y-F腫瘍で高い発現レベルを示し、34遺伝子が5Y-R腫瘍で有
 5 意に高い発現レベルを示した。

(Random-permutationテスト)

Mann-Whitney テストで選ばれた遺伝子の価値を評価するために、permutation
 テストを行い、そして各選択された遺伝子のグループ差異 (Ps) への相関がある
 10 ことを評価した。各遺伝子が、発現ベクター $v(g) = (X_1, X_2, \dots, X_{24})$ (X_i
 がサンプルの最初のセットで i サンプルの遺伝子の発現レベルを示す) で表現さ
 れるとき、理想化した発現パターンが $c = (c_1, c_2, \dots, c_{24})$ (i サンプルがF
 かRグループに属するかで $c_i = +1$ 又は 0 となる) で表現される。

遺伝子と グループ差異 P_{gc} 間の相関は、次のように定義された: すなわち、 P_{gc}
 15 $= (\mu_F + \mu_R) / (s_F + s_R)$; μ_F (μ_R) と s_F (s_R) は、新規に定義された "F" 又は "R"
 グループにおいて、各サンプルの該遺伝子 "g" の $\log_2 X$ の標準偏差を示す。

permutationテストは、 c の座標を入れ換えることによって行われた。すべての
 permutationの間に、相関値、 P_{gcs} を計算した。これらの手順は10000回、繰り返
 して行われた。偶然に、2つのグループを分類する遺伝子の可能性を暗示する p 値
 20 が、選択された58遺伝子の各々のために評価された。

(半定量RT-PCR)

RNA ($5 \mu g$) を、DNase I (Epicentre Technologies, Madison, WI, USA)
 ($1 \text{ unit} / \mu l$) で処理後、ReverscriptII reversetranscriptase (和光純薬(株)、大阪、
 25 日本) と $0.5 \mu g / \mu l$ oligo (dT) 12-18プライマーを使って単鎖cDNAを逆転写させ
 た。単鎖cDNAsの各調製物を、量的なコントロールとしてGAPDHをモニタリン
 グすることにより、次のPCR増幅のために希釈した。全てのPCRは、GeneAmp
 PCRシステム9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用い、1xPCR

バッファ-30 μ l量で以下の反応条件により行った；

94℃2分、

(94℃30秒、58-62℃30秒、及び72℃30秒)を27-35サイクル、

72℃5分。

5 GAPDHのRT-PCRのためのプライマー配列は以下である：

配列番号43 (forward) 5'-GAA AGG TGA AGG TCG GAG T-3'

配列番号44 (reverse) 5'-TGG GTG GAA TCA TAT TGG AA -3'

(半定量PCRのプライマー (無病グループで高発現する遺伝子))

10

表 4 A

Ac./HS	Forward	Reverse
M90439	配列番号45 CCAGACATCCATGGTACCTATAA	配列番号46 TATGCATTGAAACCTTACAGGGG
AF047472	配列番号47 CTGTTAAACAAAGCGAGGTTAAGG	配列番号48 GGGTTCTGCATCTCGTTTATTAG
Hs.118251	配列番号49 GACACATAGCTCATAGGCACACA	配列番号50 TTCTGGTACATGGTAAGTGCTCA
D26125	配列番号51 TCCGCCATATTGATTCTGCTTA	配列番号52 GTTTGCTTTCTGGACCATGGATA
Hs.8619	配列番号53 GATAACAACCTGGACCACATCCC	配列番号54 AACAGGCAGACGAGGTAGACAC
X16135	配列番号55 GAGAAGGATGGGTCCACCACT	配列番号56 GTACATGGGCAGCACAAATGTAT
Hs.9006	配列番号57 ATTTCAATTGGTAGTATGGCCAC	配列番号58 ATACCATGGGACAGGATTGTAAG
M18963	配列番号59 GCTCAGACCAGCTCATACCTTCAT	配列番号60 CCAAAGACTGGGGTAGGTAAAC
X07979	配列番号61 CTGGTGCTTTCTATCACCTCTTC	配列番号62 GACTAGTGTGAAACAAGATGGGC
AF018080	配列番号63 CTTGAACCCAGGAGTTTGAGAC	配列番号64 GTGCCCTCAGCTTTCTGAGTAGC
Hs.58464	配列番号65 CTGGTGCTGACTATCCAGTTGA	配列番号66 CTGGTAAACTGTCCAAAACAAGG
S79867	配列番号67 CTCTTACCTGGACAAGGTGCGT	配列番号68 GGATGAGCTCTGCTCCTTGAG
J02854	配列番号69 CAATGTTTGACCAAGTCCAGA	配列番号70 CATGTTGTCTCAGTCCCTCTATTGG
Z35309	配列番号71 GGACAGCAGCTGGAGTACACA	配列番号72 AATCAGATTTGTCGGTGCCTT
Hs.83097	配列番号73 GGCTCTGCACTAAGAACACAGAG	配列番号74 ACAACTAGCTCTCAGTTCAGGCA
Hs.79137	配列番号75 TGGAGCAGTATGACAAGCTACAA	配列番号76 AAGCAGCACTGCATAAACTGTTC
Hs.4864	配列番号77 TAAGTACTTTCTGTGGGTGCGT	配列番号78 CCACAAACAGGAAGCTATGTTCT
Y00052	配列番号79 GTACTATTAGCCATGGTCAACCC	配列番号80 CTACAGAAGGAATGATCTGCTGG
Hs.5002	配列番号81 ATCAGTACGGGGACCTTACAAAC	配列番号82 CCTGTACTGAGCTCTCCAAAGAC
U43519	配列番号83 TCCCTAGCTTCTCTCCACA	配列番号84 AGAATCATGCCTCCCCTTCT
Hs.94653	配列番号85 ACCCCTCAAGTGTAAGGAACGT	配列番号86 GGATCAAGAGTGTGTGTGTGTGT
X51441	配列番号87 CAATGCCAGAGAGAATATCCAGA	配列番号88 GATACCCATTGTGTACCCTCTCC
Hs.108623	配列番号89 CCACTCCACATAAGGGGTTTAG	配列番号90 GAGGTTCTAGCTAAGTGCAGGGT
Hs.5318	配列番号91 CCATTGACATTGGAGTTAAGTATGC	配列番号92 GGCAAAGACCACATTTAGCAAT
Hs.69469	配列番号93 GAAAGCCTATGTGAAAAGCTGGT	配列番号94 TTGTTTCCAGGCATTAAGTGTG
AA777648	配列番号95 GCATCTTAGTCCACACAGTTGGT	配列番号96 GCCCTTACAGGTGGAGTATCTTC
Hs.106131	配列番号97 CTCATAGCCAGCATGACTTCTTT	配列番号98 GGTTCACTTGTGACTGGTCTCT
X54079	配列番号99 ACTTTTCTGAGCAGACGTCCAG	配列番号100 TATCAAAAGAACACACAGGTGGC
AI041182	配列番号101 ACGTTATTCCAGTTCCTAAACC	配列番号102 AGTCTCGGGTGACTCAATATGAA
AA148265	配列番号103 AGTTGAACCCAGGTACCTTTCTC	配列番号104 CTAGGCCCTTTTAGAAAACATGG
Hs.4943	配列番号105 TACTGGGAACGACTAAGGACTCA	配列番号106 TGCTGTGTGAGTAGGTTTCTGA
Hs.106326	配列番号107 TGAGAGTCCCTCAGAGGGTATCAG	配列番号108 CTTGAAGTCAAGAGTCCCTGGTGT
M13436	配列番号109 TTTCTGTTGGCAAGTTGCTG	配列番号110 CCCTTTAAGCCCACTTCTCTC
X99920	配列番号111 GATGAGAAGATGAAGAGCTTGGG	配列番号112 GAGGAAGCTTTATTTGGGAAGAG
U22970	配列番号113 ACTTCCCTCTCTGCCTTTCTG	配列番号114 CAGATTGTTTGGGCTTCTCACT

(半定量PCRのプライマー (再発グループで高発現する遺伝子))

表 4 B

Ac./HS	Forward	Reverse
X75252	配列番号115 GTCTGGTCAGCTTTGCTTCC	配列番号116 GGCAAGTTCTGCACAGATGA
AA989127	配列番号117 CAGCTCAGTGCACCATGAAT	配列番号118 GTGGGACTGAGATGCAGGAT
Hs.128520	配列番号119 CACGGACTCATGAATGTAGTGAA	配列番号120 GTGTAGTGGCACGATCATAGCTT
HSMLN50	配列番号121 GGGACCAAACAGACCAAAGA	配列番号122 CACCCACAGAGCCTGTATT
AF058701	配列番号123 CGGAAAGGCACTATTTACAAT	配列番号124 ACAGGCCACAGGTTTGTAAC
AF043473	配列番号125 AAGCTCTTCAGCTGCGTCTC	配列番号126 CCTCCTCCTTTTCAGCTGTG
Hs.26052	配列番号127 TCTGGAACCCCTAAAAGTGTCTG	配列番号128 TCTTTCAACATCTCTCCACCCTA
Hs.77961	配列番号129 AGATACCTGGAGAACGGGAAG	配列番号130 GGAAGTAAGAAGTTGCAGCTCAG
Hs.26484	配列番号131 ATTAGGTTTCACCCAAAG	配列番号132 AGACGAGACTTGTTTTCTC
U44798	配列番号133 CAGGGACTTGGTCACAGGTT	配列番号134 TTCTTCTCCCTCCCTTCTGAT
Hs.77961	配列番号135 GATTACATCGCCCTGAACGAG	配列番号136 TCCATCAACCTCTCATAGCAAA
X64707	配列番号137 GTAAGATCCGCAGACGTAAGG	配列番号138 CTGAAGTCAGCCTCTGTAACCTC
Hs.6780	配列番号139 ACTGACCCCACTTCTTGTTG	配列番号140 ACCCTTCCCTGTTGCTGTC
Hs.153428	配列番号141 TCAAAGTATTTAGCTACTCGCC	配列番号142 TAGTCACTCCAGGTTTATGGAGG
AJ066764	配列番号143 GGGAACCTGAATTCGTATCCATC	配列番号144 CTGAATCTCAAACCTGGAGAGTG
cl.5994	配列番号145 GATCATCTTTCTGTTCCAGAG	配列番号146 CTGGAAGGTTCTCAGGTCTTTA
D67025	配列番号147 GTACGACCAGGCTGAGAAGC	配列番号148 ATCTTCGGGGCTATCCAAC
x16064	配列番号149 TCAGCCACGATGAGATGTTT	配列番号150 TGTGGATGACAAGCAGAAGC
M80469	配列番号151 ACCTTAGGAGGGCAGTTGGT	配列番号152 AGGGGTACACCTTGAACAG
E02628	配列番号153 GCATCCTACCACCAACTCGT	配列番号154 GCAGCATCACCAGACTTCAA
HUMTHYB4	配列番号155 ACAAACCCGATATGGCTGAG	配列番号156 GCCAATGCTTGTGGAATGTA
Hs.116922	配列番号157 TCGGACCATAATCCAAGTTACC	
x15940	配列番号158 TAACCCGAGAATACACCATCAAC	配列番号159 ATGGTTTTATTGACGGCAGAAG

5 (RT-PCR産物のシグナル強度測定と予後スコアの計算)

RT-PCR産物のシグナル強度を実施例1で記述した手法と同様に測定・評価し、t-テストで0.05以下のp値を示した10遺伝子を候補として選んだ;そのうち3遺伝子の発現レベルは、5y-Fグループに対して5y-Rグループで高かった。そして、7遺伝子の発現レベルは、5y-Rグループに対して5y-Fグループでより高かった。このインフォメーションを使って、node陰性乳癌の術後予後を予測するスコアリングシステムの確立を試みた。

各遺伝子の対象とする発現レベルを得るために、GAPDH発現に対するその発現比率 (ER) を次の式によって計算した;

遺伝子AのER = 癌サンプルXの遺伝子Aの半定量PCR(エチジウムブロマイド染色したバンドの強度) の16-bit のイメージングスコア/癌サンプルXの遺伝子AのGAPDHの16-bitのイメージングスコア

(node陰性乳癌の術後予後を予測するスコアリングシステムの定義)

node陰性乳癌の術後の遺伝子予後指標を構築するため、予後スコア (PS) を定義した； (5Y-Fグループに比べて5Y-Rグループで高発現する遺伝子の正規化した発現比率の合計) - (5Y-Rグループに比べて5Y-Fグループで高発現する遺伝子の正規化した発現比率の合計)

2つのグループ間の発現比の有意さはStudent's t-テストで評価した。全ての統計手法は、Statview version 5.0 (SASInstitute、Cary、NC) によった。

10 (結果)

ゲノムワイドな遺伝子発現を検討した24の乳がん患者の臨床病理所見を表3に要約した。本発明者らは、手術後5年以上の間無病生存した12例のnode陰性乳癌患者 (5Y-F)、及び外科手術の後に5年の内に乳癌が再発した12例のnode陰性乳癌患者 (5Y-R) からの腫瘍について、25,344のヒト遺伝子から構成されるcDNA
15 マイクロアレイによる遺伝子発現を検討した。臨床のバックグラウンドは、2つのグループの間で、年齢、腫瘍径、エストロゲン受容体とプロゲステロン受容体、及び病理学的に合致させた。

cDNA マイクロアレイ の データ を、 Mann-Whitney テスト と Random-permutationテストにより分析し、5Y-R及び5Y-F腫瘍間で異なる発現を示す遺伝子を同定した。このフィルターで全58遺伝子を選び、そのうち21遺伝子が5Y-R腫瘍で有意に強く発現した。そして37遺伝子が5Y-F腫瘍で高い発現レベルを示した。

5Y-R 腫瘍に比べて5Y-F腫瘍で高発現する37遺伝子には、6つのESTs と1つの仮想たんぱく質があった (表5A、各グループ間での発現の差異を“foldchange”
25 として示す)。

(5Y-R腫瘍に比べて5Y-F腫瘍で有意に高発現する遺伝子)

表 5 A

Ac./HS	種類	fold change	p値
M90439	molecular marker (EPC-1) gene	2.324	0.0014
AF047472	spleen mitotic checkpoint BUB3 (BUB3)	2.889	0.0021
Hs.118251	ESTs	2.121	0.0031
D26125	3 alpha-hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase DD4, partial cds	2.084	0.0038
Hs.8619	SRX(sex determining region Y)-box 18	3.375	0.0041
X16135	novel heterogeneous nuclear RNP protein, L protein	4.839	0.0042
Hs.9006	VAMP(vesicle-associated membrane protein)-associated protein A,33kDa	3.807	0.0058
M18963	Islet of Langerhans regenerating protein (reg)	2.022	0.0060
X07979	Integrin beta 1 subunit	2.997	0.0068
AF018080	PYRIN (MEFV)	4.016	0.0071
Hs.58464	ESTs	5.415	0.0079
S79867	type I keratin 16 [human, epidermal keratinocytes, mRNA Partial, 1422 nt]	2.254	0.0090
J02854	myosin light chain (MLC-2)	2.668	0.0090
Z35309	adenylate cyclaseB(brain)	2.264	0.0094
Hs.83097	hypothetical protein FLJ22955	4.979	0.0096
Hs.79137	protein-L isosparate(D-aspartate)O-methyltransferase	2.401	0.0105
Hs.4864	ESTs	2.043	0.0107
Y00052	Peptidylprolyl isomerase A(cyclophilin A)	2.966	0.0107
Hs.5002	copper chaperone for superoxide dismutase; CCS	2.032	0.0114
U43519	dystrophin-related protein 2 (DRP2)	2.022	0.0114
Hs.106326	ESTs	4.733	0.0123
Hs.94653	neurochondrin(KIAA0607)	2.08	0.0129
M13436	ovarian beta-A-inhibin	2.946	0.0135
X51441	serum amyloid A (SAA) protein partial, clone pAS3-alpha	2.383	0.0155
Hs.108623	thrombospondin 2	2.019	0.0174
Hs.5318	ESTs	4.38	0.0174
Hs.69469	GA17 protein	2.279	0.0197
AA777649	peripheral myelin protein 22	2.386	0.0209
Hs.106131	ESTs	2.022	0.0213
X54079	heat shock protein HSP27	5.637	0.0217
D67025	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 3	3.179	0.0359
M80469	MHC class I HLA-J gene	3.572	0.0380
A1041182	ov77e07.x1 Scores_testis_NHT Homo sapiens cDNA clone IMAGE1543364	2.321	0.0380
AA148265	RIBOSOMAL PROTEIN L21.	2.019	0.0440
Hs.4943	Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chain LIKE gene	2.426	0.0442
X99920	S100 calcium-binding protein A13	3.326	0.0456
U22970	Interferon-inducible peptide (6-16) gene	2.741	0.0465

- 5 表 5 B は5Y-Rグループ において高発現する21遺伝子をリストにした。その5
つがESTs で、一つが仮想たんぱく質をコードする。58遺伝子のこのパネルから、
次のような基準で術後予後のマーカーを選んだ；（1）症例の少なくとも60％に
位置するカットオフレベルより高いシグナル強度をもつ；（2） $|\mu R - \mu F| > 1.0$ 、
ここで μR (μF)は、5Y-R又は5Y-F症例における対数変換発現比率から導かれる平
均値示す。
- 10

(5Y-F腫瘍に比べて5Y-R腫瘍で有意に高発現する遺伝子)

表 5 B

Ac./HS	種類	fold change	p値
X75252	Prostatic Blindig protein	4.506	0.0011
AA989127	major histocompatibility complex, class I,C	5.731	0.0060
Hs.128520	ESTs	1.419	0.0067
HSMLN50	ESTs	3.482	0.0071
AF058701	DNA polymerase zeta catalytic subunit (REV3)	2.185	0.0085
AF043473	delayed-rectifier K ⁺ channel alpha subunit (KCN51),Potassium voltage-gated channel, delayed-rectifier, subfamily S, member 1	4.786	0.0144
Hs.26052	hypothetical protein MGC43306	4.829	0.0150
Hs.77961	major histocompatibility complex, class I, B	5.775	0.0152
Hs.26484	HIRA interacting protein 3	5.07	0.0157
U44798	U1-snRNP binding protein homolog (70kD)	2.615	0.0194
Hs.77961	MHC class I HLA-Bw62	5.775	0.0209
X64707	BBC1 mRNA(ribosomal protein L13)	2.758	0.0210
Hs.6780	PTK9L protein tyrosine kinase 9-like (A6-related protein)	2.749	0.0220
Hs.153428	Ests	3.164	0.0234
AI066764	lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1)	2.606	0.0275
cl.5994	ESTs	2.844	0.0286
x16064	Tumor protein, translationally-controlled 1	3.567	0.0366
E02628	polypeptide chain elongation factor-1 alpha	4.055	0.0427
HUMTHYB4	thymosin beta-4	4.05	0.0436
Hs.116922	ESTs	2.538	0.0494
x15940	ribosomal protein L31.	2.125	0.0499

- 5 5Y-Rに比べ5Y-F腫瘍で高発現する7遺伝子 (Hs.94653、M13436、Hs.5002、D67025、M80469、Hs.4864、及びHs.106326 ; p=0.0018、0.0011、0.001、0.008、0.0081、0.0018及び0.001 ; 各Student'st-テストによる)及び5Y-R腫瘍で比較的高発現する3遺伝子 (AF058701、AI066764、及びx15940 ; p=0.0351、0.00161及び0.0001 ; 各Student'st-テストによる)が基準に合致し、予後マーカーとして選択した(表 6)。

(node陰性乳癌の予後マーカーとして選別した遺伝子)

表 6

AF058701	DNA polymerase zeta catalytic subunit (REV3)
AI066764	lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1)
x15940	ribosomal protein L31.
Hs.94653	neurochondrin(KIAA0607)
M13436	ovarian beta-A-inhibin
Hs.5002	copper chaperone for superoxide dismutase; CCS
D67025	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 3
M80469	MHC class I HLA-J gene
Hs.4864	ESTs
Hs.106326	ESTs

5 GAPDH発現に対する正規化後半定量RT-PCR実験でこれらのマーカーの発現を確認した。図3は、乳癌再発(5Y-Rグループ)の12患者からのサンプルで高発現する3つのマーカー遺伝子のRT-PCRの結果を示す。図4は、5Y-F(5年生存)グループで高発現する7つのマーカー遺伝子の結果を示す。これら10遺伝子の発現比率を予後指標の定義に用いた。

10 予後スコア(PS)を次のように定義した；

PS = (5Y-R腫瘍で高発現する3遺伝子の正規化した発現比率の合計) - (5Y-F腫瘍で高発現する7遺伝子の正規化した発現比率の合計)

15 検討した24ケースの予後スコアを、各マーカー遺伝子の発現比率と共に、表7に要約した。PSシステムは、3より高い予後スコアを有する症例R1からR12については、不良予後を予測した。一方、-16より低いスコアの症例F1からF12については、良好予後を予測した。この予測は、実際のこれらの臨床結果と、100%の正確性で一致した(図5)。5Y-Rグループの平均PSは9.44、そして5Y-Fグループの平均PSは-28.92であった。

(node陰性乳癌再発の予後スコア)

表 7

No.	x15940	AF058701	AI066764	Hs 5002	Hs 94653	M13436	M80469	D67025	Hs 4864	Hs 106326	PS
1n	8.90	2.70	8.35	1.50	0.82	1.47	2.43	2.72	2.60	2.55	5.86
2n	7.02	2.19	7.48	1.14	0.50	1.51	2.32	1.27	1.89	0.62	7.44
3n	7.57	2.36	10.96	1.40	0.55	2.29	3.51	2.38	1.79	0.44	8.53
4n	8.57	2.79	9.78	1.75	1.42	2.02	3.30	3.03	3.44	3.02	3.16
5n	14.96	2.56	18.01	3.88	0.53	0.67	3.96	2.76	3.78	1.83	18.12
6n	16.94	3.97	12.76	0.11	0.73	1.50	3.19	2.01	3.60	4.41	18.12
7n	14.51	3.02	11.62	0.37	2.24	2.05	2.14	1.45	1.64	2.96	16.30
8n	9.50	2.81	10.43	2.86	1.64	1.95	5.40	3.18	1.89	1.79	4.03
9n	8.29	2.96	8.32	0.78	0.55	1.91	1.50	1.31	1.40	2.80	9.32
10n	6.78	2.06	10.59	0.39	1.93	0.70	2.49	3.56	1.27	0.84	8.25
11n	7.30	1.38	10.89	3.03	2.82	0.46	2.18	3.09	2.00	2.16	3.83
12n	8.60	3.81	15.86	3.31	3.46	0.70	3.19	1.82	2.54	2.95	10.30
1nR	4.67	0.81	4.69	4.13	2.98	3.80	7.78	5.34	7.59	6.47	-29.92
2nR	4.32	0.63	3.88	2.82	2.68	2.89	4.51	3.74	4.86	9.28	-21.95
3nR	10.54	0.56	7.28	2.40	2.06	2.10	8.18	6.02	6.02	8.55	-16.95
4nR	5.59	0.56	4.85	3.22	3.69	2.89	11.18	3.31	6.39	11.36	-31.04
5nR	5.56	0.18	4.97	5.57	4.57	1.15	3.18	4.85	5.56	12.68	-26.85
6nR	4.50	0.51	4.01	6.81	2.54	5.45	6.61	7.49	7.16	6.18	-33.22
7nR	5.09	0.97	4.72	3.14	3.74	5.57	7.95	3.94	7.90	9.71	-31.17
8nR	4.93	0.54	4.46	7.53	4.95	5.93	11.03	1.96	6.21	7.75	-35.43
9nR	5.25	1.17	5.15	3.09	3.39	3.30	10.05	2.66	4.76	10.82	-26.50
10nR	5.36	0.59	5.96	3.67	2.78	2.47	4.66	3.12	10.63	8.27	-23.69
11nR	4.99	1.02	5.71	7.48	4.51	6.22	4.61	4.28	10.65	9.20	-35.23
12nR	4.84	0.30	4.98	7.57	6.07	5.04	7.05	3.07	7.42	8.98	-35.08

5 実施例 3

原発性乳癌における術後予後予測の遺伝子発現機能の評価

(組織サンプル)

組織サンプルは実施例 1 記載の手法と同様に採取した。1995-1997年の期間において、乳癌のための手術を受けて、5年以上の間または死亡時まで臨床的に追跡調査された954人の患者の中から、手術後5年以内に死亡した10例と手術後5年以上の間無病生存した10例を標本として選んだ。2つの患者グループの臨床背景は年齢、リンパ節への転移、腫瘍径と組織型に関して、可能な限り厳密に一致させた(表 8)。最終的な予知システムをテストするのに用いた追加20ケースの臨床背景を表 9 に要約した。

(マイクロアレイ分析に用いた患者の臨床的プロフィール)

表 8

	ケース	T	N	M	ステージ	年齢	NL ^a	ly ^b	f ^c	ER ^d
生存者	MS1	2	1	0	II	52	4	1	2	P
	MS2	2	2	0	II	47	2	0	1	P
	MS3	2	2	0	II	40	5	0	1	N
	MS4	2	2	0	II	64	3	0	1	N/A
死亡者	MD1	2	2	0	II	47	5	0	0	P
	MD2	2	2	0	II	34	3	3	0	N
	MD3	2	2	0	II	66	4	0	3	N
	MD4	2	0	0	II	71	2	0	1	P

a) Number of lymph nodes involved.

b) Lymph vessel invasion: 0, no cancer cells in vessels.
3, many cancer cells in vessels.

c) Fat invasion: 0, no invasion to fat tissue; 3, severe invasion to fat tissue.

d) Estrogen receptor status: P, positive; N, negative; N/A, not available.

(RT-PCR分析に用いた患者の臨床的プロフィール)

表 9

	ケース	T	N	M	ステージ	ly ^a	f ^b
生存者	S1	2	0	0	II	0	1
	S2	2	2	0	II	1	0
	S3	2	2	0	II	0	2
	S4	2	1	0	II	1	0
	S5	2	2	0	II	3	2
	S6	2	0	0	II	0	0
	S7	2	1	0	II	0	0
	S8	2	1	0	II	0	2
	S9	2	1	0	II	1	2
	S10	2	1	0	II	0	0
死亡者	D1	2	1	0	II	0	1
	D2	2	2	0	II	0	0
	D3	2	2	0	II	3	0
	D4	2	2	0	II	0	3
	D5	2	2	0	II	1	3
	D6	2	1	0	II	0	1
	D7	2	0	0	II	0	1
	D8	2	1	0	II	0	0
	D9	2	4	0	IV	1	0
	D10	2	1	0	II	0	2

a) Lymph vessel invasion

b) Fat infiltration

	年齢 ^c	リンパ節 ^d 関与
生存者	52.8	7.6
死亡者	56.0	5.4

c) Mean of age d) Average number of lymph nodes involved

5 (臨床病理 (Clinicopathological) パラメータ)

実施例 1 で記術した手法で臨床病理パラメータを調べた。

(cDNAマイクロアレイの調製)

実施例 2 で記述した手法でcDNAマイクロアレイの調製を行った。

5

(RNA抽出とRNA増幅)

RNAをTRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で抽出した。変性RNAを除去するため、各々の抽出されたRNA ($1 \mu\text{g}$) を、3.0%ホルムアルデヒド変性ゲル上で電気泳動した。DNA混入を除去するため、RNeasyキット (QIAGEN, Valencia, CA) を用いて精製した。MessageAmp aRNAキット (Ambion, Austin, TX) によるT7 RNAポリメラーゼベースの増幅を行い、マイクロアレイ分析に用いるRNAを調製した。最初の増幅では、RNA ($5 \mu\text{g}$) を鋳型として用いた。その後、最初に増幅されたRNA (aRNA) ($2 \mu\text{g}$) を、二回目の増幅のための鋳型とした。増幅されたaRNAsはRNeasy精製キットで精製し、各aRNAの量を分光光度計により測定した。

10

15

(aRNAの標識、ハイブリダイゼーション及びデータ分析)

Amino Allyl cDNA 標識キット (Ambion, Austin, TX) により、二回目の増幅による蛍光プローブ作成用aRNA ($5 \mu\text{g}$) を用いて、ハイブリダイゼーションプローブを作成した。癌RNA及び正常なコントロールRNAに由来するプローブを、Cy5またはCy3のMono-Reactive Dye (Amersham Bioscience UK Limited, Buckinghamshire, UK) で各々標識した。

20

非結合色素を除去するために、標識プローブを、QIA quick PCR精製キット (QIAGEN, Valencia, CA) で精製した。腫瘍及び正常RNAからの蛍光標識プローブの各々10pmolを、4xマイクロアレイハイブリダイゼーション・バッファー (Amersham (UK)) 及び脱イオン化したホルムアミドと混合した。プローブ混合物を、40℃で15時間cDNAアレイにハイブリダイズさせた。その後、5分間で1回、その後10分間で2回にわたり0.2%SDSを含む0.1xSSCで洗浄した。全ての手順

25

は、AutomatedSlide Processor System (Amersham) で実行した。それぞれのハイブリダイゼーションのシグナル強度は、Gene Pix 4000 (Amersham) で読み取り、GenePix Pro 3.0 (Axon Instruments, Inc., Foster City, CA, USA) によって評価した。読み取ったシグナルは、totalgene normalization method (Yang, Y.H., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D.M., Peng, V., Ngai, J., and Speed, T.P. (2002). Nucleic Acids Res 30, e15.; Manos, E.J., and Jones, D.A. (2001). Cancer Res 61, 433-438.) によって正規化した。

生存者と死亡者のグループ間で異なる発現を示す遺伝子を確認するために、正規化したシグナルを、Mann-Whitneyテストで分析した；正規化したシグナルを一連のXに適用した。Xとはそれぞれの遺伝子及びサンプルのためのCy5/Cy3シグナル強度比率である (Ono, K., et al. (2000). Cancer Res 60, 5007-5011.)。Mann-Whitneyテストで0のU値を示した遺伝子と2つのグループ間で発現強度が2.0倍以上の違いを示したものを選んだ。S/N比が3.0未満の遺伝子は、検討から除外した。

(半定量RT-PCR及び遺伝子発現比率)

マイクロアレイのデータを検証するため、本発明者らはRNA (10 µg) を逆転写することにより、半定量RT-PCR実験をした。転写されたcDNAの濃度を調整するため、GAPDHを内部コントロールとして選び、半定量RT-PCRを実行した (Ono, K., et al. (2000). Cancer Res 60, 5007-5011.)。GAPDHのプライマーは、5'-ggaaggtgaaggtcggagt-3 (Forward)、及び5'-tgggtggaatcatattggaa-3 (Reverse) であった。プライマーの濃度を調整した後に、半定量RT-PCRを生存者と死亡者のグループからのサンプルで、選別した遺伝子について実行した。当該遺伝子 (表 10) の各々のためのプライマーは、NCBI Gen Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) のシーケンス情報とウェブサイト (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) 上のプライマー3に基づいて設計した。各半定量PCR実験は、テンプレートとして濃度を調整したcDNA (1 µl)、5UのTakara EX Taq (Takara、大津、日本)、1xPCRバッ

ファー（10mMのTris-HCl、50mMのKCl、1.5mMのMgCl₂）、10nMのdNTPsと10pmolの前方及び後方プライマーで30 μ l総量にて行った。

配列番号160 ggaaggtgaaggtcggagt

配列番号161 tgggtggaatcatattggaa

5

（半定量PCRのプライマー）

表 1 0

遺伝子	Forward	Reverse
PIIP	配列番号162 CCTOCAAAGTGTCTACTCG	配列番号163 TCGAAGCCTCTGTGCCTTT
C1r	配列番号164 GAAGTTGTGGAGGGACGTGT	配列番号165 GACTTCCAGCAGCTTCCATC
DPYSL3	配列番号166 CATGTACTGAGCAGGCCAGA	配列番号167 AAGATCTTGGCAGCGTTTGT
PTK9L	配列番号168 TTGTGATTGAGGACGAGCAG	配列番号169 AATGGTTTCCCGCTCTAGGT
CPE	配列番号170 CTCCTGAGACCAAGGCTGTC	配列番号171 TGAAGGTCTCGGACAAATCC
α -tubulin	配列番号172 GGAACGCCTGTCAGTTGATT	配列番号173 CTCAAAGCAAGCATTGGTGA
β -tubulin	配列番号174 TCTGTTTCGCTCAGGTCCTTT	配列番号175 TGGTGTGGTCAGCTTCAGAG
HSP 90-a	配列番号176 AAAAATGGCCTGAGTTAAGTGT	配列番号177 TCCTCAATTTCCCTGTGTTTG
MDH	配列番号178 TGCACACTAACAGCATGACG	配列番号179 GAATTTCTTTCCTCTGCCTGA
NDUFB3	配列番号180 GGGATAAACCAGACAAGTAGGC	配列番号181 GGACATGAGCATGGACATCA

- 10 生存者と死亡者のグループの間で遺伝子発現の強度を評価するために、各半定量PCR産物（8 μ l）を、2.5%アガロースゲル上で電気泳動し、エチジウムブロマ
- 15 イドで染色した。各々の染色されたサンプルの強度は、バックグラウンド校正を用いてAlphaImager 3300（Alpha Inonotech, San Leandro, CA）により測定した。各遺伝子の発現レベルを得るために、その発現比率を、GAPDHの発現レ
- 20 ルで正規化した。

発現比率は、以下の公式によって定義された：遺伝子Aの発現比率 = 癌サンプルX中の遺伝子Aの半定量PCRの16ビットのイメージングスコア（エチジウムブロマイドで染色したバンドの強度）/癌サンプルX中のGAPDHの16ビットのイメージングスコア

20

（原発性乳癌の予後指標（PI）の定義）

本発明者らは、5Sグループにおいて高発現する遺伝子の正規化した発現比率

の合計から、5Dのグループにおいて高発現する遺伝子の正規化した発現比率の合計を差し引くことにより、原発性乳癌の予後指標（PI）を定義した。2つのグループ間の発現比率の有意性はStudent's t-テストで評価した。5S及び5Dのグループ間のPIの比較はMann-Whitneyテストにより行った。全ての統計はStatview version 5.0を使って保管した（SAS Institute Inc., Cary, NC）。

（結果）

18,432のヒト遺伝子からなるcDNAマイクロアレイ上で、8人の乳癌患者からの腫瘍のゲノムワイドな遺伝子発現機能を調べた。患者のうちの4人は手術後5年以上の間無病生存し（5S）、4人は5年以内で、乳癌で死亡した（5D）。臨床病理学的背景は、2つのグループ間で年齢、腫瘍径、リンパ節転移、ホルモンレセプター状態と組織型について可能な限り厳密に一致させた（表8）。

5Dと5Sのグループ間で異なる発現を示す遺伝子を同定するために、本発明者らはMann-Whitney テストによってcDNA マイクロアレイのデータを分析した。これらの遺伝子のうちの6つのESTs/仮想タンパク質である合計23遺伝子は、Mann-Whitneyテストで0のU値を示し、5Sグループにおいて高発現する遺伝子である（表11）。

(マイクロアレイ分析の解析による生存グループで高発現する遺伝子群)

表 1 1

遺伝子名及び詳細	Accession Number	Fold change
IMAGE:39159 3' similar to gb:J04173 PHOSPHOGLYCERATE MUTASE, BRAIN FORM	R51864	4.304
IMAGE:22798 3', M RNA sequence	R39171	2.918
cDNA clone IMAGE:1693352 3', M RNA sequence	A1140851	2.891
CCNDBP1 cyclin D-type binding-protein 1	AF082569	3.202
ESTs	A1446435	3.251
pro-alpha-1 type 3 collagen	X14420.1	3.394
complement component C1r	J04080.1	3.396
DPYSL3 dihydropyrimidinase-like 3	D78014	3.625
ribosomal protein L6	X69391.1	3.807
PTK9L protein tyrosine kinase 9-like (A6-related protein)	Y17169.1	4.143
Homo sapiens full length insert cDNA YN88E09	AF070505.1	4.257
somatostatin receptor isoform 2 (SSTR2) gene	M81830.1	5.475
CPE carboxypeptidase E	NM_001873.1	5.807
YR-29 hypothetical protein YR-29	AJ012409.1	6.333
IMAGE:4822062, mRNA	BC034811	6.373
K1AA1832 protein, partial cds	AB058735.1	13.352
CREG cellular repressor of E1A-stimulated genes	AF084523.1	2.739
Homo sapiens putative splice factor transformer2-beta mRNA, complete cds	U61267.1	2.55
Human N-acetyl-beta-glucosaminidase (HEXB) mRNA, 3' end	M13519.1	2.698
Human cytochrome b5 mRNA, complete cds	M22865.1	2.881
Human pS2 mRNA induced by estrogen from human breast cancer cell line MCF-7	X00474.1	2.702
Human alpha-tubulin mRNA, complete cds	K00558	4.655
Homo sapiens clone 24703 beta-tubulin mRNA, complete cds	AF070561.1	3.917

- 5 表 1 2 は、5Dの腫瘍において一般に高発現しており、6つのESTs/仮想タンパク質を含み、Mann-Whitney テストでゼロのU値を持つ21遺伝子を記載する。表において、“foldchange”として、2つのグループ間の遺伝子発現の違いを示す。

(マイクロアレイ分析の解析による死亡グループで高発現する遺伝子群)

表 1 2

遺伝子名及び詳細	Accession Number	Fold change
Lyam-1 mRNA for leukocyte adhesion molecule-1	X16150.1	7.459
APM2 adipose specific 2	NM_006839.1	4.853
DNA polymerase gamma mRNA, nuclear gene encoding mitochondrial protein	U60325.1	4.269
FLJ22128 fis, clone HEP19543	AK025781	4.109
actin related protein 2/3 complex, subunit 4, 20kDa (ARPC4)	NM_005718.2	4.058
Scd mRNA for stearoyl-CoA desaturase	AB032261.1	3.794
novel heterogeneous nuclear RNP protein, L protein	X16135.1	3.771
ENSA endosulfine alpha	AF157509.1	3.511
IMAGE:26483 5' similar to gb:X15183_cds1 HEAT SHOCK PROTEIN HSP 90-ALPHA	R12732	3.086
malonyl-CoA decarboxylase (MLYCD)	NM_012213	3.067
anion exchanger 3 brain isoform (bAE3)	U05596.1	2.889
IMAGE:43550 3', mRNA sequence	H05914	2.345
cDNA FLJ23636 fis, clone CAS07176.	AK074216	2.426
IMAGE:26366 3' similar to gb:D16234 PROBABLE PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE ER-60 PRECURSOR	R20554	2.519
Similar to hypothetical protein PRO2831, clone MGC:23813 IMAGE:4273837, mRNA, complete cds	BC017905.1	2.551
FLJ40629 hypothetical protein FLJ40629	AK097948.1	2.417
ribosomal protein L29 (hmrp129) mRNA, complete cds	U10248.1	2.203
EST, clone IMAGE:745452, 3'end	AA625869	2.591
KIAA1554 KIAA1554 protein	AB046774.1	2.544
IMAGE:53316 3' similar to SP:MDHC_MOUSE F14152 MALATE DEHYDROGENASE, CYTOPLASMIC	R15814	2.867
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 3 (12kD, B12), clone MGC:9039 IMAGE:3881592	BC018183	4.972

- 5 5Sグループにおいて高発現する23遺伝子及び5Dグループにおいて高発現する21遺伝子から、以下の基準に従って術後予後の予測マーカーを選んだ；（1）マイクロアレイ分析では、全ての症例の5S及び5D間のシグナル強度の違いが2.0倍より大きい；（2）半定量PCRの5S及び5D間のシグナル強度が有意に異なる（Student'st-テストによるp値<0.05）；（3）半定量PCRの結果は、独立した3回
- 10 の実験によって再確認した。5S腫瘍において高発現する7遺伝子、及び5D腫瘍において高発現する3遺伝子は予後マーカーを選択するこれらの基準を満たした。

5Sグループにおいて高発現する7遺伝子は、pro-alpha-1 type 3 collagen (PIIIP)、complement component C1r、dihydropyrimidinase-like 3 (DPYSL3)、proteintyrosinekinase 9-like (PTK9L)、carboxy peptidase E (CPE)、 α -tubulinと β -tubulinをコードしている遺伝子から構成されている。これらのマーカー遺伝子のStudent'st-テストのp値は、それぞれ0.00039、0.0012、0.0042、0.036、0.039、0.034と0.00069であった。

5Dグループにおいて高発現する3つのマーカー遺伝子は、heat shock protein HSP 90-alpha gene、malatedehydrogenase、及びNADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 3 (NDUFB3)をコードしていた。当該遺伝子のStudent'st-テストのp値は、それぞれ0.05、0.0055及び0.011であった。

本発明者らは、半定量RT-PCRの実験結果を、内部コントロールとしてGAPDHで正規化し評価することによりマーカー遺伝子の選択を検証した。

本発明者らは無作為に選んだ追加20症例を調べるために半定量PCRを行った。これらの患者のうちの10人は手術後5年以内に乳癌で死亡し、そして、残りの10人は5年以上の間無病生存した。図7は、5S腫瘍において高発現する7つのマーカー遺伝子のRT-PCRの結果を示す。図8は、5D腫瘍において高発現する3つのマーカー遺伝子のRT-PCRの結果示す。

本発明者らは、次のように予後指標 (PI) を定義した：(5Sグループにおいて高発現する遺伝子の正規化した発現比率の合計) - (5Dグループにおいて高発現する遺伝子の正規化した発現比率の合計)。選ばれたマーカー遺伝子の発現比率と共に、更なる試験例のための予後指標を、表13にまとめた。

(遺伝子の発現比率と予後指標)

表 1 3

5Sで高発現する遺伝子						5Dで高発現する遺伝子					Sum of S	Sum of D	PI +
	PIIP	C1r	DPYSL3	PTK9L	CPE	A-tubulin	B-tubulin	HSP 90	MDH	NDUFB3			
S1	1.8	4.0	2.1	3.3	2.4	0.8	2.5	1.5	0.2	1.5	16.9	3.2	13.7
S2	5.7	3.5	3.3	3.4	6.0	1.2	5.1	2.2	0.6	2.2	28.1	5.0	23.1
S3	3.1	5.8	2.2	3.4	8.1	1.8	5.3	1.5	0.4	1.5	29.7	3.5	26.2
S4	7.1	10.2	8.6	6.0	16.0	4.1	8.0	3.4	4.8	3.4	60.0	11.5	48.5
S5	6.8	7.4	7.2	6.9	11.2	2.7	7.0	5.5	3.6	5.5	49.1	14.6	34.5
S6	4.0	4.2	1.7	2.2	3.6	0.9	6.0	2.9	0.9	2.9	22.7	6.6	16.1
S7	2.3	4.0	1.1	1.6	0.6	0.7	3.4	0.4	0.3	0.4	13.7	1.1	12.6
S8	3.3	3.6	1.1	0.7	0.8	1.3	5.0	2.3	1.4	2.3	15.9	6.0	9.8
S9	3.1	3.9	2.7	3.7	2.9	1.6	4.1	1.0	1.2	1.0	21.9	3.2	18.8
S10	2.9	3.0	0.9	1.5	1.2	1.0	1.7	1.3	0.4	1.3	12.2	3.0	9.2
D1	0.1	2.9	0.4	1.9	2.9	0.7	0.8	3.4	3.0	3.4	9.6	9.7	-0.1
D2	0.2	0.6	0.1	0.2	0.8	0.2	0.8	1.0	4.9	1.0	2.9	7.0	-4.1
D3	0.2	3.7	0.2	1.0	0.6	0.6	2.8	3.6	6.6	3.6	9.0	13.8	-4.8
D4	0.2	1.4	0.4	0.9	1.0	0.5	1.7	3.5	3.6	3.5	6.1	10.7	-4.6
D5	0.1	1.3	0.1	0.9	0.6	0.5	1.0	3.2	0.3	3.2	4.5	6.7	-2.2
D6	2.2	2.5	1.2	1.9	2.0	0.5	1.7	3.8	3.5	4.2	12.0	11.5	0.5
D7	2.2	2.1	0.9	1.9	2.4	0.3	1.6	1.9	1.4	2.0	11.5	5.3	6.2
D8	1.6	2.7	1.1	2.6	1.8	0.4	1.8	3.4	2.8	3.4	12.0	9.6	2.5
D9	1.2	1.4	0.6	1.6	1.2	0.6	2.4	2.2	0.7	2.2	9.2	5.0	4.1
D10	0.5	0.8	0.4	0.6	0.4	0.4	1.3	3.6	1.6	3.6	4.5	8.9	-4.4

* PIIP, C1r, DPYSL3, CPE, α 及び β -tubulin のERの合計

**HSP90, MDH, 及びNDUFB3のERの合計

+ PI Sの合計-Dの合計

- 5 PIは、5Sグループの全10症例（S1からS10）の高い予後指標（>7）及び5Dグループの全10症例（D1からD10）の予後指標（<7）（図9）の実際の臨床結果を正確に予測した。5SグループのPIは21.2であった、そして、5DグループのPIは-0.7であった。ここでPI値7は、明らかに5S腫瘍と5D腫瘍を区別していた（ $p=0.0002$ ）。

10 産業上の利用の可能性

本発明の術後予後予測システムは、乳癌患者の術後リスクの予測に有効である。さらに、本発明の乳癌関連遺伝子の広範囲に及び遺伝子発現リストは乳癌の進行

についての様々な情報を提供するとともに、乳癌治療の潜在的ターゲット分子の予測が可能となる。

配列表フリーテキスト

5 配列番号 1 ～ 1 8 1 : 合成物

10

請 求 の 範 囲

1. 乳癌の術後予後予測に関与する以下の定義の少なくとも1よりなる遺伝子；

1) エストロゲンレセプター陰性の乳癌において、外科手術後5年以内に死亡した乳癌患者からの遺伝子 (5y-Dグループ) と数年以上無病 (disease-free) 生存した患者からの遺伝子 (5y-Sグループ) とが、その発現機能によって区別することができたマーカー遺伝子群。

2) 手術時にリンパ節への転移がなかった (node陰性) (n0) 乳癌において、手術後5年以内に再発したn0乳癌患者からの遺伝子 (5Y-Rグループ) と5年以上の間無病生存した患者からの遺伝子 (5Y-Fグループ) とが、その発現機能によって区別することができたマーカー遺伝子群。

3) 原発性乳癌において、外科手術後5年以内に死亡した乳癌患者からの遺伝子 (5Dグループ) と数年以上無病生存した患者からの遺伝子 (5Sグループ) とが、その発現機能によって区別することができたマーカー遺伝子群。

2. 原発性乳癌の術後予後予測に関与する以下の配列より選ばれる遺伝子；

pro-alpha-1 type 3 collagen (PIIIP)、
complement component C1r、
dihydropyrimidinase-like 3 (DPYSL3)、
protein tyrosine kinase 9-like (PTK9L)、
carboxypeptidase E (CPE)、
alpha-tubulin、
beta-tubulin、
heat shock protein HSP 90-alpha gene、
malate dehydrogenase、
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 3 (NDUFB3)。

3. 原発性乳癌の術後予後予測に関与する予後の良い群で高発現する以下から選ばれる遺伝子；

pro-alpha-1 type 3 collagen (PIIIP)、

complement component C1r,
 dihydropyrimidinase-like 3 (DPYSL3),
 protein tyrosine kinase 9-like (PTK9L),
 carboxypeptidase E (CPE),
 5 alpha-tubulin,
 beta-tubulin。

4. 原発性乳癌の術後予後予測に関与する予後の悪い群で高発現する以下から選ばれる遺伝子；

heat shock protein HSP 90-alpha gene,
 10 malate dehydrogenase,
 NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 3 (NDUFB3)。

5. 手術時にリンパ節への転移がなかった（node陰性）（n0）乳癌において、術後予後予測に関与する以下の配列より選ばれる遺伝子；

AF058701/ DNA polymerase zeta catalytic subunit (REV3) 、
 15 AI066764/ lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1),
 x15940/ ribosomal protein L31.,
 Hs.94653/ neurochondrin(KIAA0607),
 M13436/ ovarian beta-A-inhibin,
 Hs.5002/ copper chaperone for superoxide dismutase; CCS,
 20 D67025/ proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 3,
 M80469/ MHC class I HLA-J gene,
 Hs.4864/ ESTs,
 Hs.106326/ ESTs。

6. 手術時にリンパ節への転移がなかった（node陰性）（n0）乳癌において、術後予後予測に関与する予後の悪い群で高発現する以下から選ばれる遺伝子；

AF058701/ DNA polymerase zeta catalytic subunit (REV3) 、
 AI066764/ lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1),
 25 x15940/ ribosomal protein L31.。

7. 手術時にリンパ節への転移がなかった (node陰性) (n0) 乳癌において、術後予後予測に關与する予後の良い群で高発現する以下から選ばれる遺伝子 ;

Hs.94653/ neurochondrin(KIAA0607)、

M13436/ ovarian beta-A-inhibin、

5 Hs.5002/ copper chaperone for superoxide dismutase; CCS、

D67025/ proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 3、

M80469/ MHC class I HLA-J gene、

Hs.4864/ ESTs、

Hs.106326/ ESTs。

10 8. エストロゲンレセプター陰性の乳癌において、術後予後予測に關与する以下の配列より選ばれる遺伝子 ;

Hs.108504/ FLJ20113/ ubiquitin-specific protease otubain 1

Hs.146550/ MYH9/ myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle

Hs.194691/ RAI3/ retinoic acid induced 3

15 Hs.1975/ TDRD3/ tudor domain containing 3

Hs.203952/ TRRAP/ transformation/transcription domain-associated protein

Hs.278607/ GSA7/ ubiquitin activating enzyme E1-like protein

Hs.429/ ATP5G3/

20 ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrialF0complex, subunitc(subunit9)isoform3

Hs.75305/ AIP/ aryl hydrocarbon receptor interacting protein

Hs.81170/ PIM1/ pim-1 oncogene

Hs.99987/ ERCC2/

25 excision repaircross-complementingrodentrepairdeficiency, complementationgroup2

Y12781/ Transducin (beta) like 1 protein

Hs.104417/ KIAA1205 protein

cl.21783/ Hypothetical protein

Hs.112628/ Hypothetical protein: MGC43581

Hs.170345/ Hypothetical protein FLJ13710

Hs.53996/ weakly similar to zinc finger protein 135

5 Hs.55422/ Hypothetical protein

Hs.112718/ EST

Hs.115880/ EST

Hs.126495/ EST

9. 予後の悪い群で高発現する遺伝子である請求項 8 から選ばれる遺伝子。

10 10. 請求項 1 ～ 9 のいずれかに記載の遺伝子に特異的なプローブ。

11. 請求項 1 ～ 10 のいずれかに記載の遺伝子及び／又はプローブが搭載された DNA マイクロアレイ。

12. DNA マイクロアレイが繊維型マイクロアレイである請求項 11 記載のマイクロアレイ。

15 13. 請求項 1 ～ 10 のいずれかに記載の遺伝子及び／又はプローブをマーカーにする乳癌の術後予後の検査方法。

14. 請求項 11 又は 12 に記載のマイクロアレイを使用する乳癌の術後予後の検査方法。

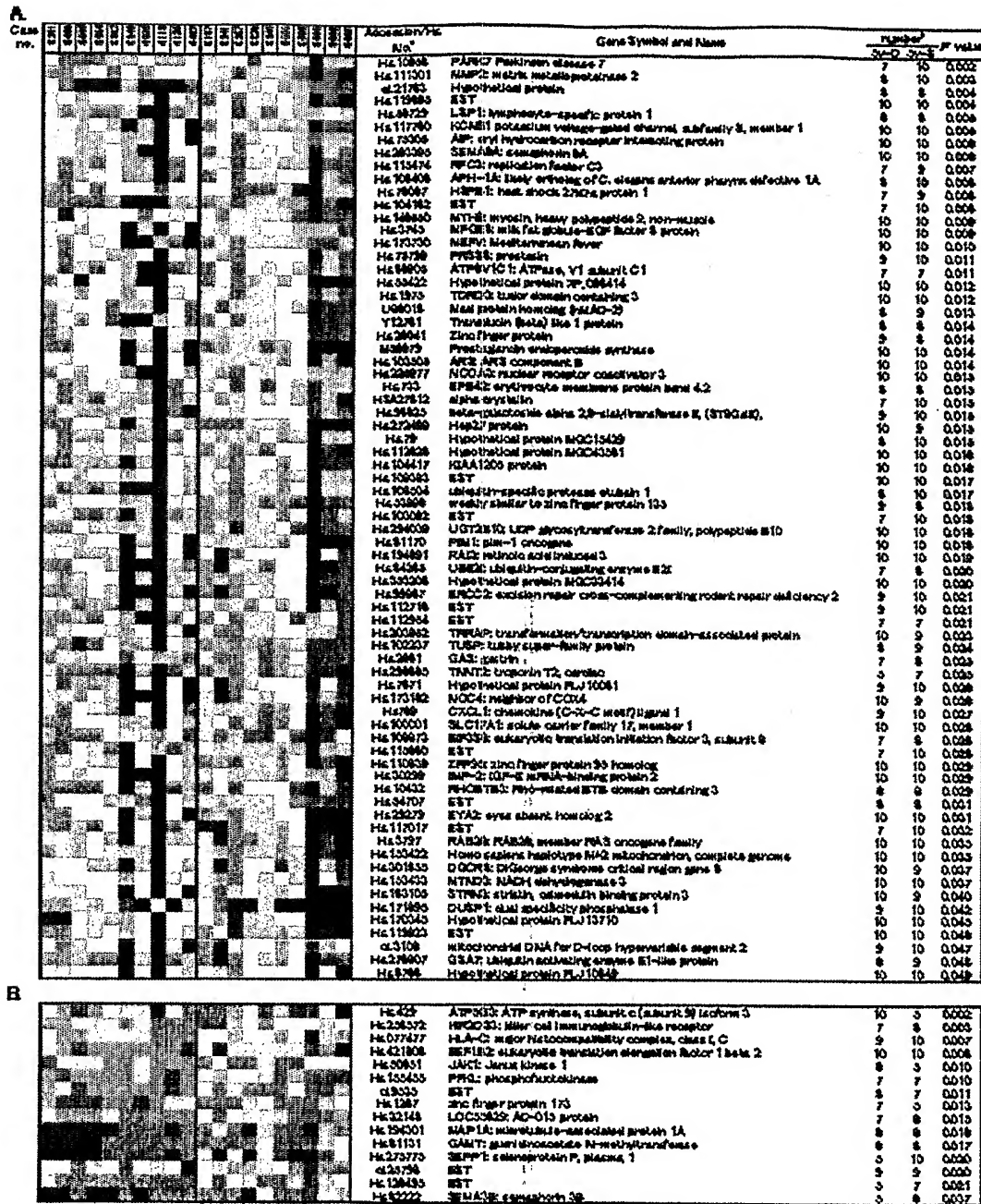
20 15. 請求項 1 ～ 10 のいずれかに記載の遺伝子及び／又はプローブをマーカーにする乳癌の術後予後を制御する癌治療薬のスクリーニング方法。

16. 請求項 11 又は 12 に記載のマイクロアレイを使用する乳癌の術後予後を制御する癌治療薬のスクリーニング方法。

17. 請求項 1 ～ 10 のいずれかに記載の遺伝子及び／又はプローブをマーカーにする試薬を含む乳癌の術後予後の診断キット。

25 18. 請求項 17 記載の診断キットがマイクロアレイを包含するものである診断キット。

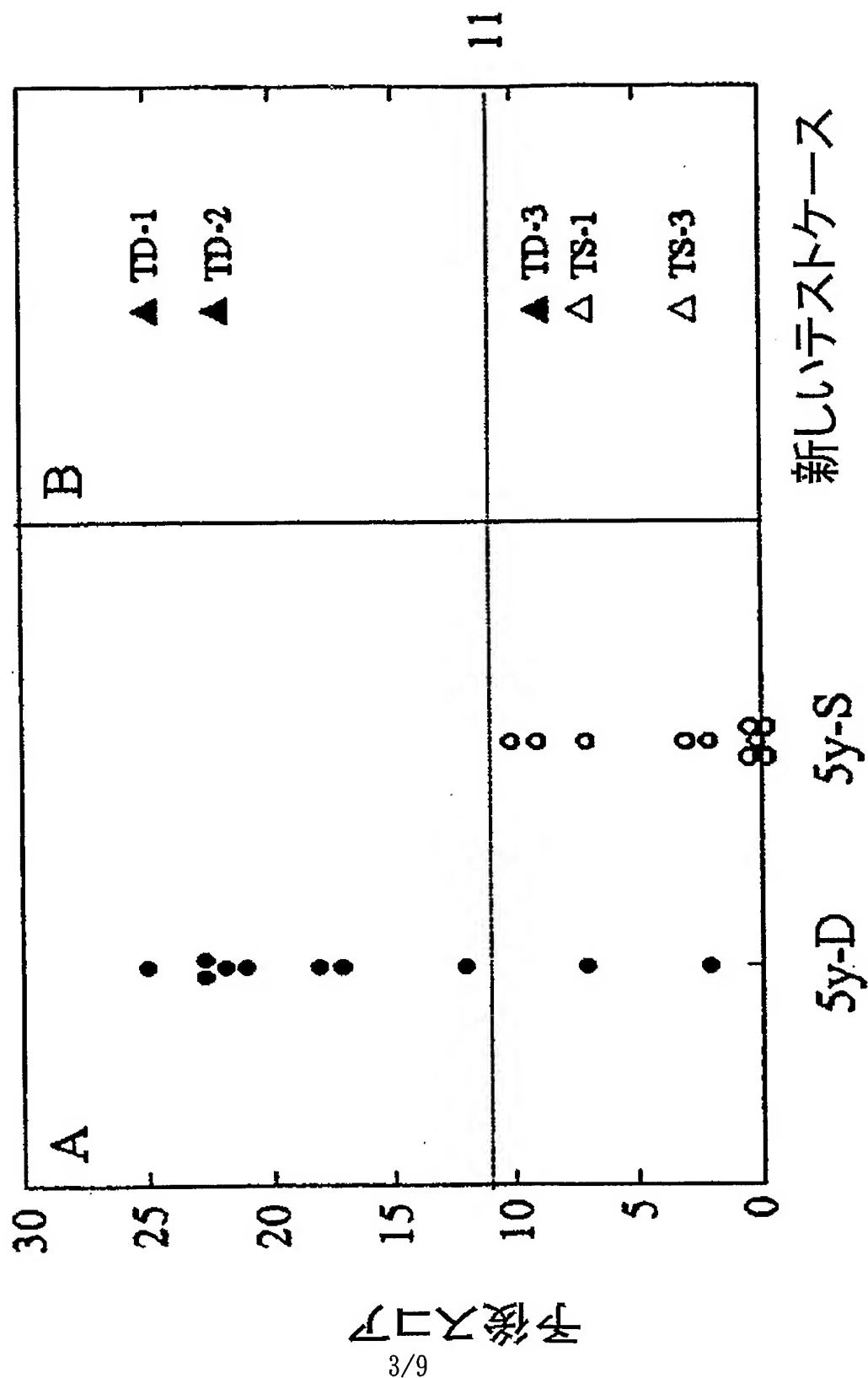
19. マイクロアレイが繊維型マイクロアレイである請求項 18 記載の診断キット。



2

	5y-D										5y-S										
	D-1	D-2	D-3	D-4	D-5	D-6	D-7	D-8	D-9	D-10	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6	S-7	S-8	S-9	S-10	
Hs.108504	$p=0.0485$
Hs.146550	$p=0.0049$
Hs.1975	$p=0.0149$
Hs.203952	$p=0.0081$
Hs.278607	$p=0.0056$
Hs.75305	$p=0.0343$
Hs.81170	$p=0.0208$
Hs.99987	$p=0.0147$
Hs.112628	$p=0.0088$
Hs.53996	$p=0.0003$
Hs.112718	$p=0.0099$
Hs.115880	$p=0.0022$
GAPD	

図 3



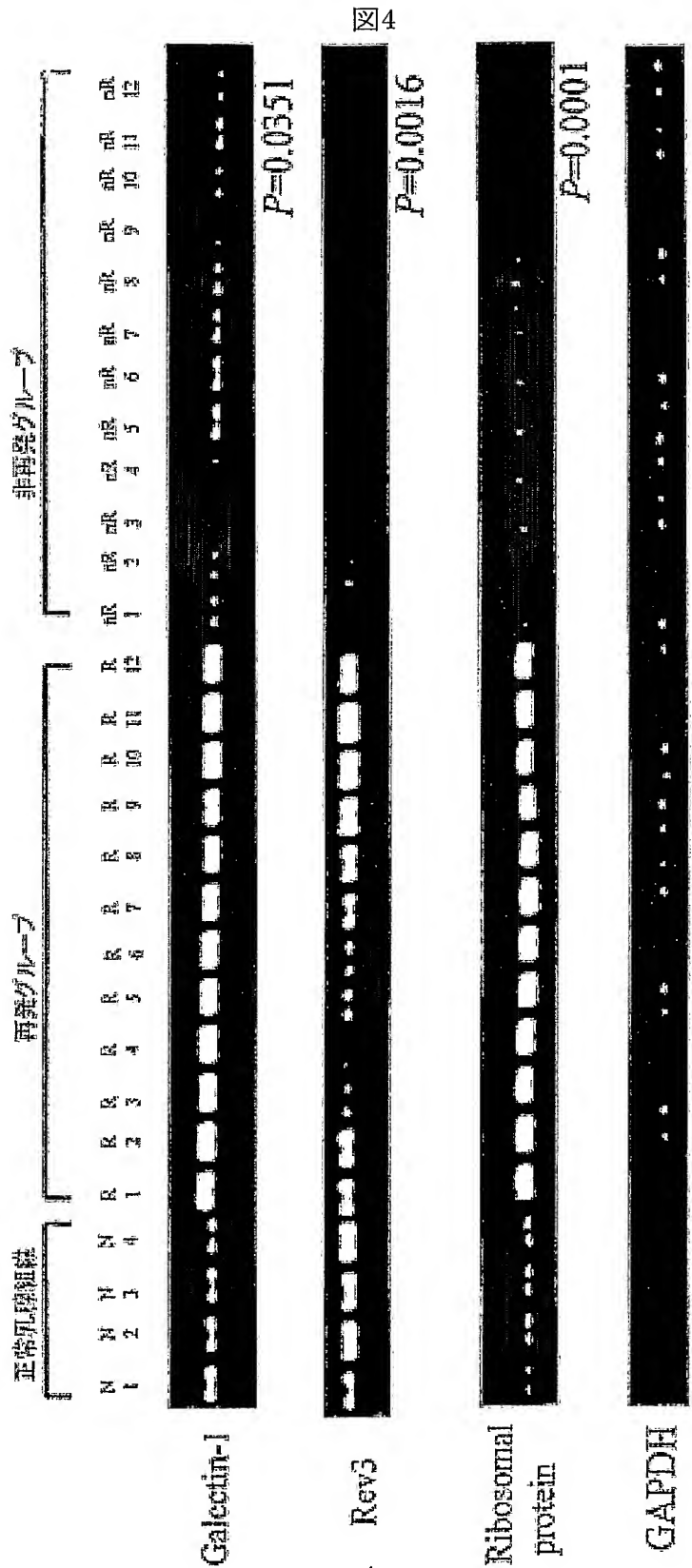


図5

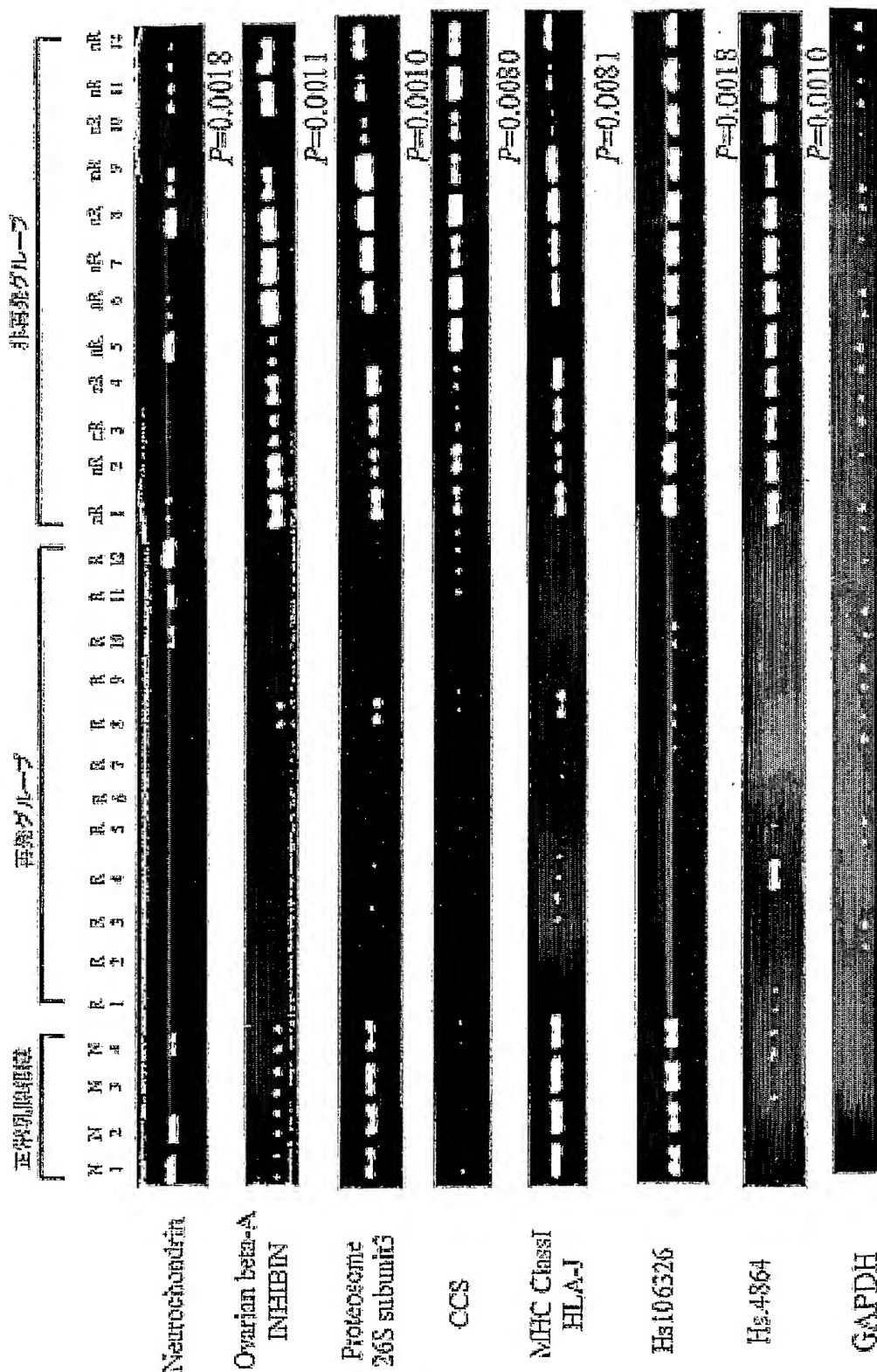


図6

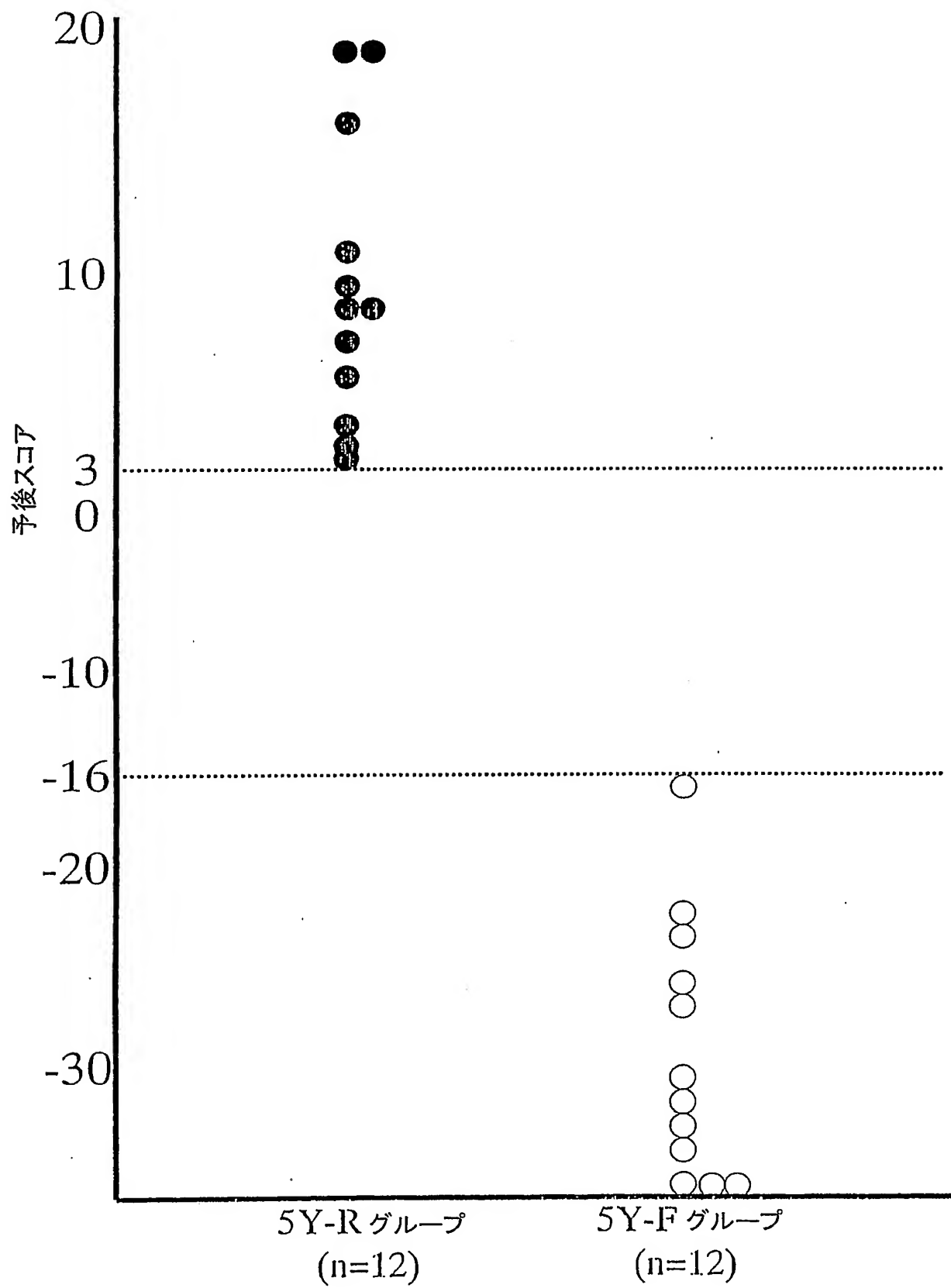
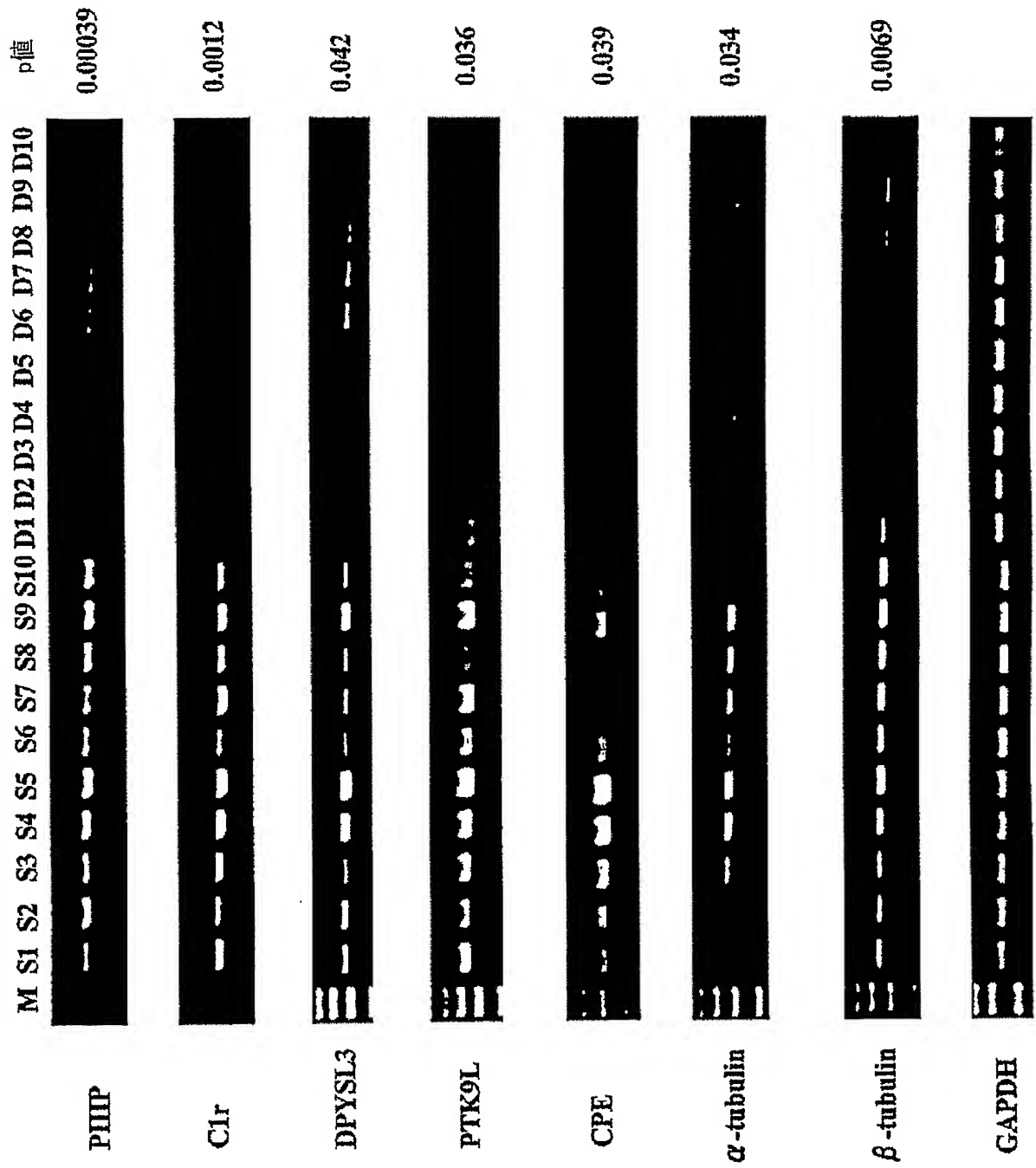


図7



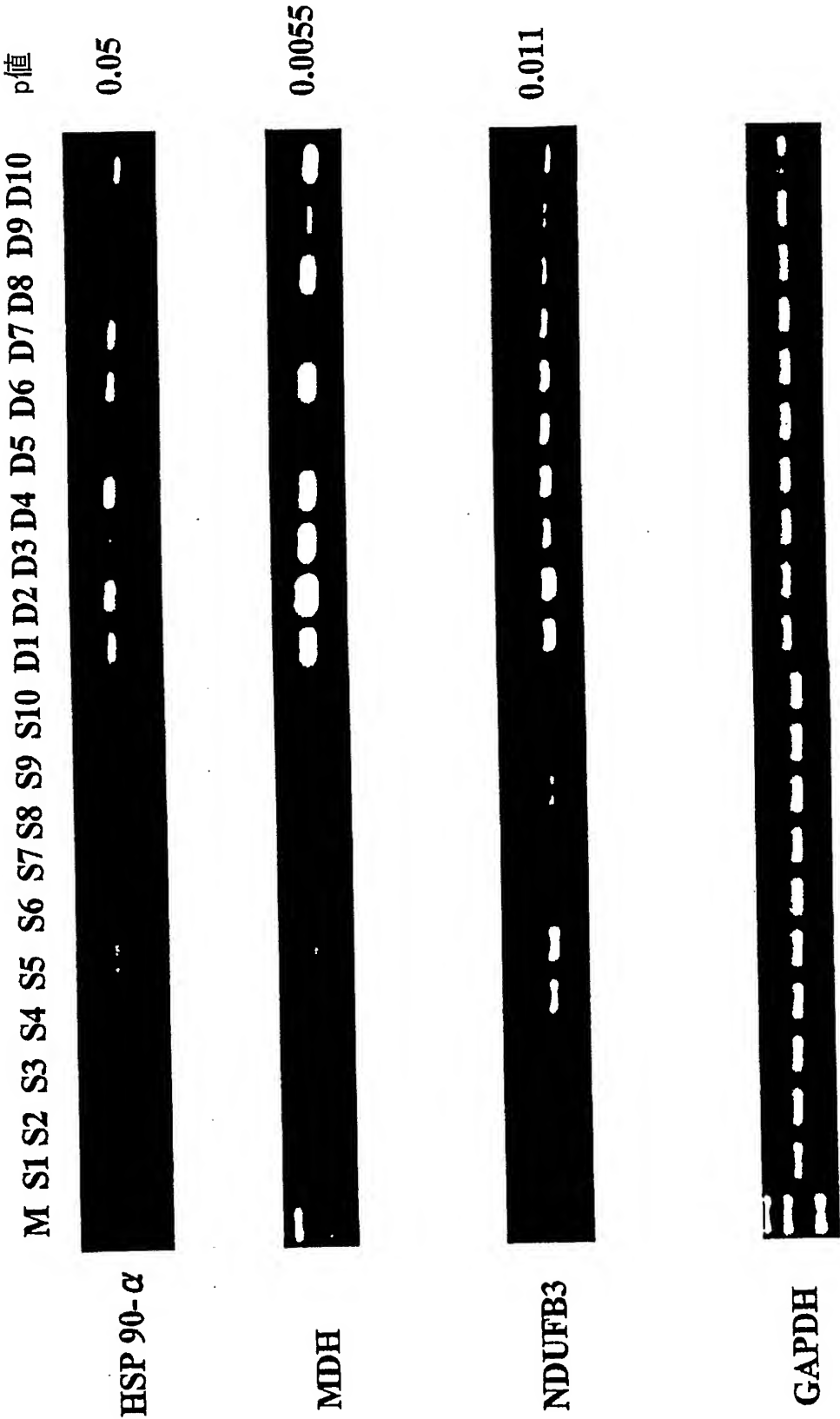
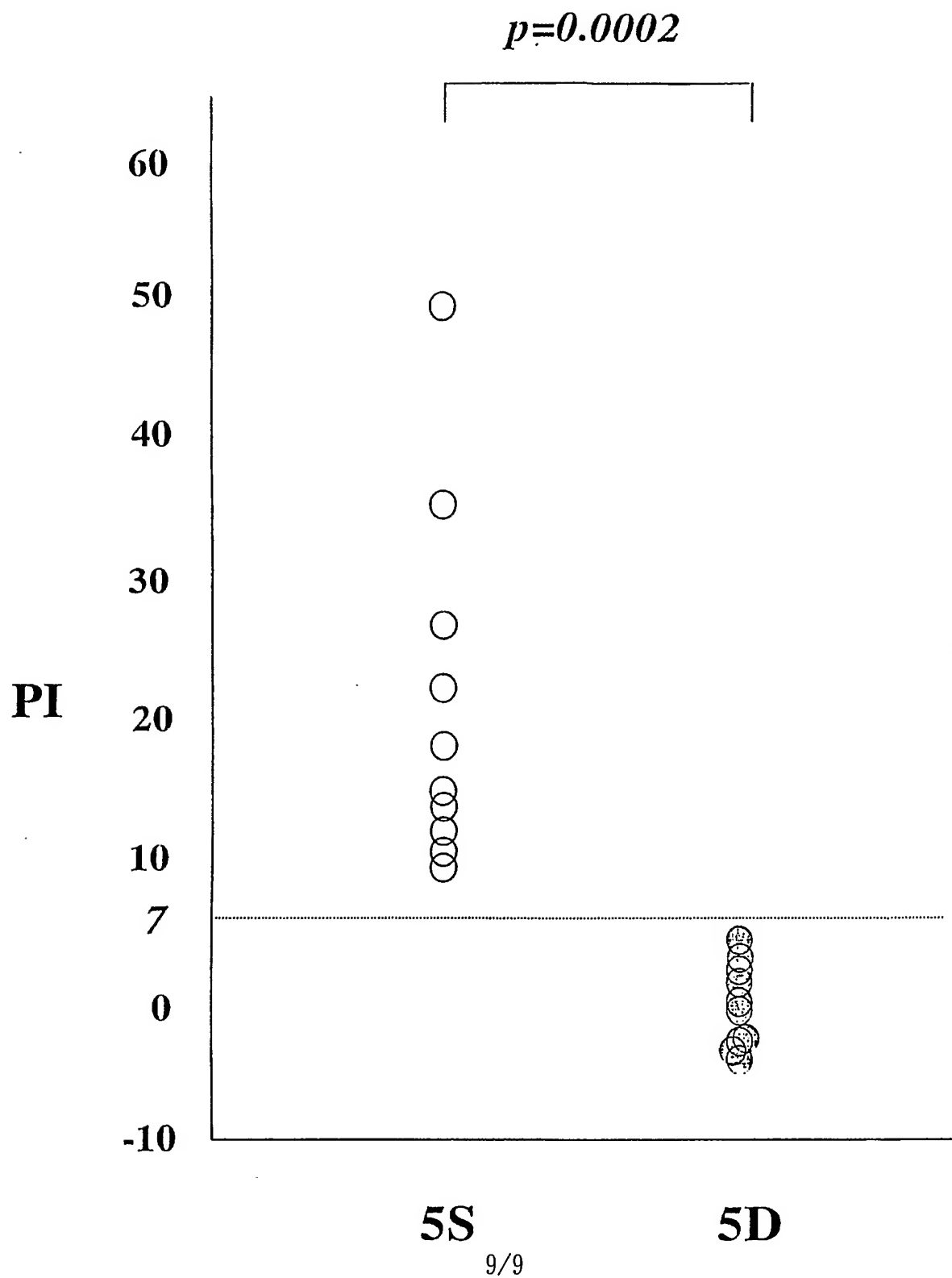


図8

図9



SEQUENCE LISTING

<110> Nippon Medical School,
Mitsubishi Rayon Co., Ltd.

<120> Genes involved in predicting postoperative
prognosis breast cancers

<130> P04-156PCT

<150> JP 2004-048593

<151> 2004-02-24

<160> 181

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 1

ggaaggtgaa ggtcggagt

19

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 2

tgggtggaat catattggaa

20

<210> 3
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized

<400> 3
acattcatc tgctccctca tag

23

<210> 4
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized

<400> 4
ctgcctagac ctgaggactg tag

23

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized

<400> 5
actgaggcct tttggtagtc g

21

<210> 6
<211> 24
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 6

tctcttttatt gtgatgtca gtgg

24

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 7

aaatccttct cgtgtgttga ctg

23

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 8

cagtcattgag ggctaaaaac tga

23

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 9

gaagacaaca agttttaccg gg

22

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 10

atggttttat tgacggcaga ag

22

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 11

aggacacgtc ctctcctctc tc

22

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 12

taaagctagc gaaggaacgt aca

23

<210> 13
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized

<400> 13
tcccttcctgt ttcctcagtg tt

22

<210> 14
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized

<400> 14
cctgccccga taaaaatattc tac

23

<210> 15
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized

<400> 15
ttgaccttaa gcctcttttc ctc

23

<210> 16
<211> 23
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 16

ataacgtaca ttcccatgac acc

23

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 17

actttcaaga tgggaccaag g

21

<210> 18

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 18

atatacacag aagcatgacg cag

23

<210> 19

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 19

ttgctggact ctgaaatata cc

22

<210> 20

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 20

ttcccctgta cagtatttca ctca

24

<210> 21

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 21

ctgagcaatc tgctctatcc tct

23

<210> 22

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 22

gttccagatt cgtgagaatg act

23

<210> 23

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 23

accagtaaca actgtgggat gg

22

<210> 24

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 24

caaatgagct acaacacaca agg

23

<210> 25

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 25

ccccctccac ctgtacata at

22

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 26

gttttcgttt ggctggttgt g

21

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 27

gtctgagatt ttactgcacc g

21

<210> 28

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 28

attgctaagg ataagtgctg ctc

23

<210> 29

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 29

gttcagtata gaagcctgtg ggt

23

<210> 30

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 30

ttcttaggcc atcccttttc tac

23

<210> 31

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 31

gcatctgaat gtctttctcc cta

23

<210> 32

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 32

ccataggatc ttgactccaa cag

23

<210> 33
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized

<400> 33
actgggagtg gaggaatta gag

23

<210> 34
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized

<400> 34
ctaagtgaag ctccattggg atg

23

<210> 35
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized

<400> 35
caaactgcaa actagctccc taa

23

<210> 36
<211> 23
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 36

aggtaaccca aagtgacaaa cct

23

<210> 37

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 37

aagactaaga gggaaaatgt ggg

23

<210> 38

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 38

aggtaaccca aagtgacaaa cct

23

<210> 39

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 39

ttaagtgagt ctccttggct gag

23

<210> 40

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 40

agggcccta tatccaatac cta

23

<210> 41

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 41

agtcattcag aagccattga gac

23

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 42

tgggtggaat catattggaa

20

<210> 43
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized

<400> 43
gaaaggtgaa ggtcggagt

19

<210> 44
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized

<400> 44
tgggtggaat catattggaa

20

<210> 45
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized

<400> 45
ccagacatcc atggtaccta taa

23

<210> 46
<211> 23
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 46

tatgcatiga aaccttacag ggg

23

<210> 47

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 47

ctgttaaaca aagcgagggtt aagg

24

<210> 48

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 48

gggttctgca tctcgtttat tag

23

<210> 49

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 49
gacacatagc tcataggcac aca

23

<210> 50
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized

<400> 50
ttctggtaca tggtaagtgc tca

23

<210> 51
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized

<400> 51
tccgccatat tgattctgct ta

22

<210> 52
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized

<400> 52
gtttgctttc tggaccatgg ata

23

<210> 53
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized

<400> 53
gataacaact ggaccacatc cc 22

<210> 54
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized

<400> 54
aacaggcaga cgaggtagac ac 22

<210> 55
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized

<400> 55
gagaaggatg ggtccaccag t 21

<210> 56
<211> 23
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 56

gtacatgggc agcacaaatg tat

23

<210> 57

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 57

atttcattgg tagtatggcc cac

23

<210> 58

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 58

ataccatggg acaggattgt aag

23

<210> 59

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 59

gctcagacca gctcatactt cat

23

<210> 60

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 60

ccaaagactg gggtaggtaa aac

23

<210> 61

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 61

ctggtgcttt ctatcacctc ttc

23

<210> 62

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 62

gactagtgtg aaacaagatg ggc

23

<210> 63

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 63

cttgaaccca ggagtttgag ac

22

<210> 64

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 64

gtgcctcagc tttctgagta gc

22

<210> 65

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 65

ctgggtgctga ctatccagtt ga

22

<210> 66

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 66

ctggtaaact gtccaaaaca agg

23

<210> 67

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 67

ctcttacctg gacaaggctc gt

22

<210> 68

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 68

ggatgagctc tgctccttga g

21

<210> 69

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 69
caatgtttga ccagtcccag a 21

<210> 70
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized

<400> 70
catgttgtct cagtcctcta ttgg 24

<210> 71
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized

<400> 71
ggacagcagc tggagtacac a 21

<210> 72
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized

<400> 72
aatcagattt gtcggcgcct t 21

<210> 73

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 73

ggctctgcac taagaacaca gag

23

<210> 74

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 74

acaactagct ctcagttcag gca

23

<210> 75

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 75

tggagcagta tgacaagcta caa

23

<210> 76

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 76

aagcagcact gcataaactg ttc

23

<210> 77

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 77

taagtacttt cctgtgggtc gct

23

<210> 78

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 78

ccacaaacag gaagctatgt tct

23

<210> 79

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 79

gtactattag ccatgggtcaa ccc

23

<210> 80

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 80

ctacagaagg aatgatctgg tgg

23

<210> 81

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 81

atcagtacgg ggaccttaca aac

23

<210> 82

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 82

cctgtactga gctctccaaa gac

23

<210> 83
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized

<400> 83
tccctagctt cctctccaca

20

<210> 84
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized

<400> 84
agaatcatgc ctcccccttct

20

<210> 85
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized

<400> 85
accctcaag tgtaaggaac tg

22

<210> 86
<211> 23
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 86

ggatcaagag tgtgtgtgtg tgt

23

<210> 87

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 87

caatgccaga gagaatatcc aga

23

<210> 88

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 88

gatacccatt gtgtaccctc tcc

23

<210> 89

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 89

ccactccaca taaggggttt ag

22

<210> 90

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 90

gaggttctag ctaagtgcag ggt

23

<210> 91

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 91

ccattgacat tggagttaag tatgc

25

<210> 92

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 92

ggcaaagacc acatttagca at

22

<210> 93
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized

<400> 93
gaaagcctat gtgaaaagct ggt

23

<210> 94
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized

<400> 94
ttgtttccag gcattaagtg tg

22

<210> 95
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized

<400> 95
gcatcttagt ccacacagtt ggt

23

<210> 96
<211> 23
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 96

gcccttacag gtggagtatc ttc

23

<210> 97

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 97

ctcatagcca gcatgacttc ttt

23

<210> 98

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 98

ggttcacttg tgactggcca tct

23

<210> 99

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 99

acttttctga gcagacgtcc ag

22

<210> 100

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 100

tatcaaaaga acacacaggt ggc

23

<210> 101

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 101

acgttatgcc cagttcctaa acc

23

<210> 102

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 102

agtctcgggt gactcaatat gaa

23

<210> 103

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 103

agttgaaccc aggtaccttt ctc

23

<210> 104

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 104

ctaggccctt ttagaaaaca tgg

23

<210> 105

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 105

tactgggaac gactaaggac tca

23

<210> 106

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 106

tgctgtgttg agtaggtttc tga

23

<210> 107

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 107

tgagagtcct cagagggtat cag

23

<210> 108

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 108

cttgaagtca agagtcctgg tgt

23

<210> 109

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 109

tttctgttgg caagttgctg

20

<210> 110

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 110

ccctttaagc ccacttcctc

20

<210> 111

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 111

gatgagaaga tgaagagctt gga

23

<210> 112

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 112

gaggaagctt tatttgggaa gag

23

<210> 113

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 113

acttccctct ctgcccttct g

21

<210> 114

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 114

cagattgttt tgggcttctc act

23

<210> 115

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 115

gtctggtcag ctttgcttcc

20

<210> 116

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 116

ggcaagtict gcacagatga

20

<210> 117

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 117

cagctcagtg caccatgaat

20

<210> 118

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 118

gtgggactga gatgcaggat

20

<210> 119

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 119

cacggactca tgaatgtagt gaa

23

<210> 120

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 120

gtgtagtggc acgatcatag ctt

23

<210> 121

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 121

gggaccaaac agaccaaaga

20

<210> 122

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 122

cacccacag agcctgtatt

20

<210> 123

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 123

cggaaggca ctatttcaca at

22

<210> 124

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 124

acaggccac aggtttgtac c

21

<210> 125

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 125

aagctcttca gctgcgtctc

20

<210> 126

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 126

cctcctccctt ttcagctgtg

20

<210> 127

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 127

tctggaaccc taaaagtgct gt

22

<210> 128

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 128

tctttcaaca tctctccacc cta

23

<210> 129

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 129

agatacctgg agaacgggaa g

21

<210> 130

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 130

ggaagtaaga agttgcagct cag

23

<210> 131

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 131

attaggtttc acccaaag

18

<210> 132

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 132

agacgagact tgttttctc

19

<210> 133

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 133

cagggacttg gtcacaggtt

20

<210> 134

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 134

ttctttctccc tccccttgat

20

<210> 135

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 135

gattacatcg ccctgaacga g

21

<210> 136

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 136

tccatcaacc tctcatagca aa

22

<210> 137

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 137

gtaagatccg cagacgtaag g

21

<210> 138

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 138

ctgaagtcag cctctgtaac ctc

23

<210> 139

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 139

actgacccca cttcttgtgg

20

<210> 140

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 140

acccttcctt gttgtgtc

19

<210> 141

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 141

tcaaagtatt tagctgactc gcc

23

<210> 142

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 142

tagtcactcc aggtttatgg agg

23

<210> 143
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized

<400> 143
gggaacttga attcgtatcc atc

23

<210> 144
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized

<400> 144
ctgaatctca aacctggaga gtg

23

<210> 145
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized

<400> 145
gatcatcttt cctgttccag ag

22

<210> 146
<211> 22
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 146

ctggaagggtt ctcaggtctt ta

22

<210> 147

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 147

gtacgaccag gctgagaagc

20

<210> 148

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 148

atcttcgggg ctatccaact

20

<210> 149

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 149

tcagccacga tgagatgttc

20

<210> 150

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 150

tgtggatgac aagcagaagc

20

<210> 151

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 151

accttaggag ggcagttggt

20

<210> 152

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 152

aggggtcaca ccttgacag

20

<210> 153

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 153

gcatcctacc accaactcgt

20

<210> 154

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 154

gcagcatcac cagacttcaa

20

<210> 155

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 155

acaaacccga tatggctgag

20

<210> 156

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 156

gccaatgctt gtggaatgta

20

<210> 157

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 157

tcggaccata atccaagtta cc

22

<210> 158

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 158

taacccgaga atacaccatc aac

23

<210> 159

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 159

atggttttat tgacggcaga ag

22

<210> 160

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 160

ggaaggtgaa ggtcggagt

19

<210> 161

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 161

tgggtggaat catattggaa

20

<210> 162

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 162

cctccaactg ctcctactcg

20

<210> 163

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 163

tcgaagcctc tgtgtccttt

20

<210> 164

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 164

gaagttgtgg agggacgtgt

20

<210> 165

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 165

gattccagc agcttccatc

20

<210> 166

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 166

catgtactga gcaggccaga

20

<210> 167

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 167

aagatcttgg cagcgtttgt

20

<210> 168

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 168

ttgtgattga ggacgagcag

20

<210> 169

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 169

aatggtttcc cgctctaggt

20

<210> 170

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 170

ctcctgagac caaggctgtc

20

<210> 171

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 171

tgaaggtctc ggacaaatcc

20

<210> 172

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 172

ggaacgcctg tcagttgatt

20

<210> 173
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized

<400> 173
ctcaaagcaa gcattggtga

20

<210> 174
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized

<400> 174
tctgttcgct caggtccttt

20

<210> 175
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized

<400> 175
tggtgtggtc agcttcagag

20

<210> 176
<211> 22
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 176

aaaaatggcc tgagttaagt gt

22

<210> 177

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 177

tcctcaattt ccctgtgttt g

21

<210> 178

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 178

tgacactaa cagcatgacg

20

<210> 179

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 179

gaatttcttt cctctgcctg a

21

<210> 180

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 180

gggataaacc agacaagtag gc

22

<210> 181

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized

<400> 181

ggacatgagc atggacatca

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012455

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, C12Q1/68, C12M1/00, C12M1/34, G01N33/53, G01N33/574, G01N37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/12, C12Q1/68, C12M1/00, C12M1/34, G01N33/53, G01N33/574, G01N37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	CHU, M.L. et al., Isolation of cDNA and genomic clones encoding human pro- α 1(III) collagen. Partial characterization of the 3' end region of the gene., J.Biol.Chem., 1985, Vol.260, No.7, pages 4357 to 4363	<u>1-3, 10-12</u> 13-19
A	VAN DE VIJVER, M.J. et al., A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer., N.Engl.J.Med., 2002, Vol.347, No.25, pages 1999 to 2009	1-3, 10-19
P, X	NAGAHATA, T. et al., Expression profiling to predict postoperative prognosis for estrogen receptor-negative breast cancers by analysis of 25,344 genes on a cDNA microarray. Cancer Sci., 2004. Mar., Vol.95, No.3, pages 218 to 225	1-3, 10-19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
10 December, 2004 (10.12.04)

Date of mailing of the international search report
28 December, 2004 (28.12.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012455

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions as set forth in claims 1 to 9 are inventions relating to genes per se. Since each of the genes as set forth in claims 2, 5 and 8 cannot be considered as a novel gene, the inventions as set forth in claims 1 to 9 are divided into 40 groups of inventions including 10 genes as set forth in claim 2, 10 genes as set forth in claim 5 and 20 genes as set forth in claim 8 and these groups of inventions cannot be considered as a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
The inventions relating to pro-alpha-1 type 3 collagen (PIIIP) in the inventions as set forth in claims 1 to 3 and 10 to 19.

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12N 15/12, C12Q 1/68, C12M 1/00, C12M 1/34, G01N 33/53, G01N 33/574, G01N 37/00		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12N 15/12, C12Q 1/68, C12M 1/00, C12M 1/34, G01N 33/53, G01N 33/574, G01N 37/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	CHU, M. L. et al. Isolation of cDNA and genomic clones encoding human pro- α 1(III) collagen. Partial characterization of the 3' end region of the gene. J. Biol. Chem. 1985, Vol. 260, No. 7, p. 4357-4363	1-3, 10-12 13-19
A	VAN DE VIJVER, M. J. et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. N. Engl. J. Med. 2002, Vol. 347, No. 25, p. 1999-2009	1-3, 10-19
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 10. 12. 2004		国際調査報告の発送日 28. 12. 2004
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 高堀 栄二 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (2004年1月)

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-9に記載されている発明は遺伝子自体の発明であるが、請求の範囲2、5、8に記載されている遺伝子は、いずれも新規な遺伝子であるとは認められないので、請求の範囲1-19に記載された発明は、請求の範囲2に記載されている10の遺伝子、請求の範囲5に記載されている10の遺伝子、請求の範囲8に記載されている20の遺伝子の40の発明群に区分され、当該発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1-3、10-19に記載された発明のうち、pro-alpha-1 type 3 collagen(PIIIP)に係る発明

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。